

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E 0399 W0	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 03768	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/11/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17/12/1998
Anmelder LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerisierbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerisierbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerisierbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



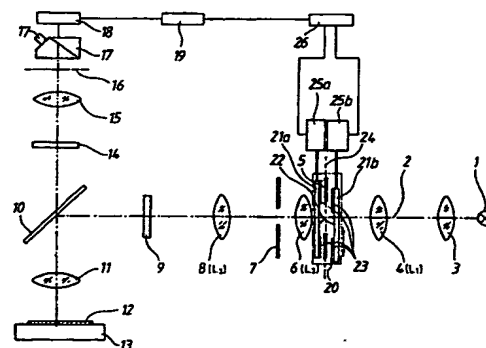
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G02B 21/16, 21/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/36451</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juni 2000 (22.06.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03768</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1999 (27.11.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 58 206.4 17. Dezember 1998 (17.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR GMBH [DE/DE]; Ernst-Leitz-Strasse 17-37, D-35578 Wetzlar (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEISS, Albrecht [DE/DE]; Schillerstrasse 18, D-35440 Linden (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>	

(54) Title: METHOD FOR THE INDIVIDUAL ADAPTATION OF EXCITATION INTENSITIES IN A MULTIBAND FLUORESCENCE MICROSCOPE AND MULTIBAND FLUORESCENCE MICROSCOPE FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR INDIVIDUELLEN ANPASSUNG VON ANREGUNGSINTENSITÄTEN BEI EINEM MULTIBAND-FLUORESCENZ-MIKROSKOP UND MULTIBAND-FLUORESCENZ-MIKROSKOP ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

(57) Abstract

The invention relates to a method for the individual adaptation of excitation intensities in a multiband fluorescence microscope with several excitation bands that are different in their spectrums and with pertaining fluorescence bands. The intensities of the individual fluorescence bands in the microscope image are determined and compared with standard intensity values greater than or equal to zero. For every excitation band that is assigned to a fluorescence intensity deviating from the standard intensity values a selective filter (23; 28, 29, 31, 32) is introduced into the illumination optical path. The transmission degree of said illumination optical path is variably adjusted in such a manner that by attenuating the excitation band the pertaining fluorescence intensity is adjusted to its standard intensity value. A multiband fluorescence microscope for carrying out said method has a set of filter slides (20) close to the aperture diaphragm (5) which set consists of individually displaceable, closely spaced apart filter slides (21; 21a, 21b) with selective filters (23; 28, 29, 31, 32) with a continuously adjustable transmission degree for every excitation band and with at least one free opening (22). The invention also relates to various advantageous embodiments of the set of filter slides (20).



(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit mehreren spektral verschiedenen Anregungsbändern und zugeordneten Fluoreszenzbändern angegeben. Die Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild werden bestimmt und mit Intensitäts-Sollwerten größer oder gleich Null verglichen. Für jedes Anregungsband, das einer von den Intensitäts-Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, wird ein selektives Filter (23; 28, 29, 31, 32) in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht und dessen Transmissionsgrad stufenlos so eingestellt, daß durch Dämpfung des Anregungsbandes die zugeordnete Fluoreszenz-Intensität auf ihren Intensitäts-Sollwert eingestellt wird. Ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens weist dicht neben der Aperturblende (5) einen Filterschieber-Satz (20) aus einzeln verschiebbaren, dicht beabstandeten Filterschiebern (21; 21a, 21b) mit selektiven Filtern (23; 28, 29, 31, 32) mit kontinuierlich einstellbarem Transmissionsgrad für jedes Anregungsband und mit mindestens einer freien Öffnung (22) auf. Es werden verschiedene vorteilhafte Ausgestaltungen des Filterschieber-Satzes (20) angegeben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens entsprechend den Merkmalen des Oberbegriffs der unabhängigen Ansprüche.

Bei der Multiband-Fluoreszenz-Mikroskopie steht der Anwender häufig vor dem Problem, daß die verschiedenen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild unterschiedliche Intensitäten aufweisen und nicht gleichmäßig sichtbar sind. Die Ursache liegt häufig in den unterschiedlichen Anregungsintensitäten im Beleuchtungsstrahlengang oder auch in der unterschiedlichen Sperrung der Fluoreszenzintensitäten durch ein Sperrfilter im Abbildungsstrahlengang. Auch unterschiedliche Konzentrationen der Fluoreszenz-Farbstoffe für die verschiedenen Anregungsbänder schon beim Anfärben der zu betrachtenden Objekte oder das allmählichen Ausbleichen der Farbstoffe, das sogenannte Fading, führen zu unterschiedlichen Intensitäten der Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild. Die unterschiedlichen Intensitäten der Fluoreszenzbänder erweisen sich insbesondere dann als problematisch, wenn das Mikroskop-Bild fotografisch festgehalten werden soll. Dann wird der intensitätsschwache Anteil des Fluoreszenzlichts auf dem Foto zu schwach wiedergegeben oder ist gar nicht sichtbar. Nur möglichst gleiche Intensitäten der Fluoreszenzbänder ermöglichen einwandfreie Fotos des Mikroskop-Bildes.

Die US 5,371,624 gibt ein Fluoreszenz-Mikroskop mit nur zwei Anregungsbändern an, in dem die Intensitäten der beiden Anregungsbänder abwechselnd beeinflusst werden können. Es enthält einen Beleuchtungsstrahlengang mit einer Lichtquelle und einem Anregungsfilter, das aus dem Licht der Licht-

quelle mehrere Anregungsbänder unterschiedlicher Lichtwellenlängen erzeugt. Ferner weist es einen Teilerspiegel, ein Ausgangsfilter (auch als Sperrfilter oder Emissionsfilter bezeichnet) für das Fluoreszenzlicht sowie ein Filterelement zur Beeinflussung der Intensitäten der Anregungsbänder auf.

- 5 Das Filterelement kann durch Kippen gegenüber der optischen Achse stufenlos zwischen zwei Endstellungen mit zwei fest vorgegebenen Werten der Transmissionsgrade des einen bzw. des anderen Anregungsbandes umgeschaltet werden. In der einen Endstellung dämpft es nur das erste Anregungsband, in der anderen Endstellung nur das zweite Anregungsband und zwischen den beiden Endstellungen keines der beiden Anregungsbänder. Eine Absenkung des Transmissionsgrads des jeweiligen Anregungsbandes ist nur bis zu dem fest vorgegebenen Wert möglich. Eine Variation zwischen einer maximalen Transmission und einem Wert Null, d.h. bis zu einer vollständigen Unterdrückung eines der beiden Anregungsbänder, ist jedoch nicht möglich.
- 10
- 15 Außerdem können nur zwei Anregungsbänder beeinflusst werden.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens anzugeben, in welchen wahlweise eines oder mehrere der Anregungsbänder entweder teilweise oder auch vollständig ausgefiltert werden können. Dazu soll der Transmissionsgrad für jedes Anregungsband mit einfachen Mitteln stufenlos einstellbar sein.

20

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die kennzeichnenden Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Unteransprüche.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren geht von einem bekannten Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop aus, in dem in einem Beleuchtungstrahlengang aus dem Licht einer Lichtquelle mithilfe eines Anregungsfilters mehrere Anregungsbänder unterschiedlicher Lichtwellenlängen erzeugt werden. Die Anregungsbänder beleuchten ein mit Fluoreszenz-Farbstoffen präpariertes Fluor-

30

reszenz-Objekt und werden von diesem in frequenzverschobene Fluoreszenzbänder umgesetzt.

Erfindungsgemäß werden im Mikroskopbild zunächst die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder bestimmt und mit vorher festgelegten Intensitäts-Sollwerten verglichen. Die Bestimmung der Fluoreszenz-Intensitäten kann beispielsweise visuell oder mithilfe eines Intensitätsmessers vorgenommen werden. Dieser kann beispielsweise aus einer Video- oder CCD-Kamera mit nachgeschaltetem Bildanalyse-System bestehen.

Dabei kann für jedes Fluoreszenzband ein anderer Intensitäts-Sollwert festgelegt sein. In der Praxis orientieren sich die Sollwerte aber an konkreten Aufgabenstellungen des Mikroskop-Anwenders. Soll beispielsweise das Mikroskop-Bild entweder fotografisch oder mit einer Videokamera dokumentiert werden und dabei jedes Fluoreszenzband im Foto oder im Video-Bild gleich hell wiedergegeben werden, hängt die Höhe der Sollwerte von der spektralen Empfindlichkeit des Films bzw. der Kamera ab. Daher muß deren spektrale Empfindlichkeit bei der Festlegung der Sollwerte für die verschiedenen Anregungsbänder berücksichtigt werden.

So müssen die gewünschten Sollwerte alle gleich - und zwar gleich der niedrigsten Fluoreszenz-Intensität - sein, sofern der Film oder die Kamera alle Spektralfarben mit gleicher Intensität wiedergibt. Ist die spektrale Empfindlichkeit der Videokamera oder des Films jedoch nicht konstant, so müssen entsprechend unterschiedliche Sollwerte für die verschiedenen Fluoreszenzbänder festgelegt werden, um die Fluoreszenzbänder gleich hell wiedergeben zu können.

Sollen andererseits bestimmte Fluoreszenzbänder auf dem Foto oder dem Videobild nicht erscheinen, also ausgeblendet werden, so müssen für diese die Sollwerte gleich Null sein. Dabei erweist es sich als günstig, wenn zusätzlich für die nicht ausgeblendeten Fluoreszenzbänder die Sollwerte gleich der niedrigsten ihrer Intensitäten sind. Dann erscheinen diese Fluoreszenzbänder alle gleich hell.

Für jedes Anregungsband, das einer von den Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, wird erfindungsgemäß ein auf das betreffende Anregungsband abgestimmtes selektives Filter in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht. Sein spektraler Transmissionsverlauf ist so ausgelegt, daß
5 ausschließlich die Intensität des betreffenden Anregungsbandes reduziert wird, die übrigen Spektralbereiche aber ungehindert durchgelassen werden.

In einem erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein Filterschieber-Satz aus mehreren einzeln verschiebbaren Filterschiebern dicht neben der Aperturblenden-
10 ebene senkrecht in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt.

Der Aufbau der Filterschieber hängt von der Anzahl der verschiedenen Anregungsbänder des Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops ab. Bei einer Anzahl von n Anregungsbändern besitzt jeder Filterschieber n auf die Anregungsbänder abgestimmte, selektive Filter, die Flächenbereiche mit hohen und niedrigen
15 Transmissionsgraden aufweisen.

Die unterschiedlichen Transmissionsgrade werden erzielt, indem nur bestimmte Flächenanteile des Strahlquerschnitts mit separaten Filter-Flächenelementen belegt werden. Dabei wird auf eine möglichst gleichmäßige Flächenbelegung des Strahlquerschnitts geachtet, so daß keine einseitige Abschattung
20 des Strahlquerschnitts und damit auch keine einseitige Ausleuchtung der Pupillen erfolgt. Dadurch wird eine schiefe Beleuchtung und damit ein laterales Wandern der Bildpunkte beim Fokussieren vermieden.

Die Filter müssen unabhängig voneinander einzeln oder kombiniert mit dem gewünschten Flächenbereich bzw. der gewünschten Transmission in den Beleuchtungsstrahlengang einfügbar sein. Dabei müssen bei n Anregungsbändern maximal $n-1$ Filter miteinander kombinierbar, d.h. gleichzeitig in den Beleuchtungsstrahlengang einfügbar, sein. Dies ist ausreichend, da nie alle Anregungsbänder gleichzeitig gedämpft werden müssen, weil in der Regel ein Anregungsband den Intensitäts-Sollwert liefert und unverändert bleibt. Ebenso
25 müssen nicht alle Anregungsbänder gleichzeitig ausgelöscht werden, da dies einem Abschalten der Beleuchtung gleichkommt.
30

Um die erforderlichen Kombinationen aus $n-1$ Filtern zu erzielen, sind in einer vorteilhaften Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops mit n Anregungsbändern auf $n-1$ Schiebe-Ebenen $n-1$ einzeln verschiebbare Filterschieber angeordnet, die dicht parallel neben
5 der Aperturblendenebene in geringem Abstand zueinander liegen und in Kombination wirksam sind. Mit jedem Filterschieber kann jeweils ein Filter für ein Anregungsband passend eingestellt werden, so daß insgesamt maximal $n-1$ Anregungsbänder (eines weniger als die maximale Anzahl) gezielt gedämpft oder ausgelöscht werden können.

10 Für zwei Anregungsbänder ist es ausreichend, wenn die beiden erforderlichen Filter in einer einzigen Schiebe-Ebene ($n-1=1$) angeordnet sind, da entweder nur das eine oder nur das andere Filter in den Beleuchtungsstrahlengang eingeschoben werden muß. Daher wird ein Filterschieber-Satz zur Beeinflussung von zwei Anregungsbändern vorzugsweise einteilig, also mit nur einem Filter-
15 schieber, aufgebaut. Für mehr als zwei Anregungsbänder muß jedoch ein entsprechend mehrteiliger Filterschieber-Satz mit $n-1$ einzeln verschiebbaren Filterschiebern vorgesehen werden.

Außer den selektiven Filtern für die verschiedenen Anregungsbänder weist jeder Filterschieber mindestens eine freie Öffnung mit dem Strahldurchmesser
20 des Beleuchtungsstrahlengangs auf. Dabei ist neben jedem Filter eine freie Öffnung angeordnet. Je nach Ausführungsform können die Filter auch direkt um eine einzige freie Öffnung gruppiert sein. Der Transmissionsgrad der Filter nimmt in Verschieberichtung mit zunehmendem Abstand von der freien Öffnung ab. Jedes Filter weist dabei einen Flächenbereich mit dem geringsten
25 Transmissionsgrad und einem Minstdurchmesser gleich dem Strahldurchmesser x auf. Wenn dieser Flächenbereich in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht ist, wird das zugehörige Anregungsband maximal, d.h. auf den Wert Null, gedämpft.

Durch richtiges Positionieren jedes einzelnen Filters im Beleuchtungsstrahlengang wird der auf den Beleuchtungsstrahlengang wirksame Transmissions-
30 grad individuell genau so eingestellt, daß durch Dämpfung des dem Filter zu-

geordneten Anregungsbandes die daraus resultierende Fluoreszenz-Intensität mit ihrem Intensitäts-Sollwert übereinstimmt. Zur Durchführung dieses Verfahrensschritts sind jedem Filterschieber separate Verstellmittel zugeordnet, die durch Verschieben und/oder Drehen des Filterschiebers das vollständige oder
5 teilweise Überdecken des Beleuchtungsstrahlengangs mit dem geeigneten Flächenbereich des Filterschiebers bewirken. So kann wahlweise die freie Öffnung oder eines oder mehrere der Filter oder Kombinationen aus Filterflächen und der freien Öffnung in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Wenn dieser letzte Verfahrensschritt für alle Filter und damit alle An-
10 regungsbänder vorgenommen wurde, stimmen alle Fluoreszenz-Intensitäten mit ihren Sollwerten überein.

Auch nach optimaler Einstellung der Fluoreszenz-Intensitäten durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens mithilfe eines angegebenen Multi-
band-Fluoreszenz-Mikroskops werden nach einiger Zeit wieder Abweichungen
15 der Fluoreszenz-Intensitäten von den Sollwerten auftreten. Dies liegt daran, daß die verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffe für die verschiedenen Anregungsbänder unterschiedlich schnell verblassen, d.h. sie zeigen ein spezifisches Fading.

Daher werden in einer vorteilhaften Ausführung des Verfahrens die zeitlichen
20 Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten fortlaufend bestimmt. Die im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der Filter werden dann wiederholt in bestimmten zeitlichen Abständen so eingestellt, daß die Fluoreszenz-Intensitäten stets wieder mit ihren Sollwerten zur Übereinstimmung gebracht werden.

Eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung des Verfahrens gestattet einen automatischen Fading-Ausgleich. Dazu werden die zeitlichen Veränderungen der
25 Fluoreszenz-Intensitäten automatisch fortlaufend bestimmt. Dazu kann beispielsweise das Mikroskop-Bild automatisch fortlaufend mit einer Video-Kamera aufgenommen und die darin enthaltenen Fluoreszenz-Intensitäten mit
30 einem Bildanalyse-System bestimmt und mit den vorgegebenen Sollwerten verglichen werden.

Dann werden die Transmissionsgrade der Filter automatisch fortlaufend verändert und angepaßt, so daß die Fluoreszenz-Intensitäten stets auf den Intensitäts-Sollwerten gehalten werden. Dazu können beispielsweise motorisch betriebene Verstellmittel eingesetzt werden. Die Ansteuerung der Motoren und
5 Regelung der Fluoreszenz-Intensitäten auf die Sollwerte kann durch eine Elektronik und einen Rechner erfolgen, dem die Signale der Videokamera bzw. des Bildanalyse-Systems zugeführt werden.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der schematischen Zeichnung näher erläutert. Es zeigen :

- 10 **Fig. 1** : einen Strahlengang eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops;
Fig. 2a-d : verschiedene Ausgestaltungen eines Filterschiebers für ein Zweiband-Fluoreszenz-Mikroskop;
Fig. 2e : den spektralen Transmissionsverlauf der Anregungsbänder und
15 der zugeordneten Filter eines Filterschiebers für ein Zweiband-Fluoreszenz-Mikroskop;
Fig. 3a-c : verschiedene Ausgestaltungen eines Filterschiebers für einen zweiteiligen Filterschieber-Satz eines erfindungsgemäßen Dreiband-Fluoreszenz-Mikroskops;
20 **Fig. 3d** : den spektralen Transmissionsverlauf der Anregungsbänder und der zugeordneten Filter eines Filterschiebers für ein Dreiband-Fluoreszenz-Mikroskop;
Fig. 4a-b : verschiedene Ausgestaltungen eines Filterschiebers für einen dreiteiligen Filterschieber-Satz eines erfindungsgemäßen
25 Vierband-Fluoreszenz-Mikroskops;
Fig. 4c : den spektralen Transmissionsverlauf der Anregungsbänder und der zugeordneten Filter eines Filterschiebers für ein Vierband-Fluoreszenz-Mikroskop;

Fig. 1 zeigt einen Strahlengang eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Von einer Lichtquelle 1 geht ein Beleuchtungsstrahlengang mit einer
30

optischen Achse 2 aus, in dem nacheinander ein Kollektor 3, ein erstes Linsenglied 4, eine Aperturblende 5, ein zweites Linsenglied 6, eine Leuchtfeldblende 7, ein drittes Linsenglied 8 und ein Anregungsfilter 9 zur Erzeugung der Anregungsbänder angeordnet sind. Der Beleuchtungsstrahlengang wird an
5 einem Strahlteiler 10 zu einem Objektiv 11 umgelenkt. Er passiert das Objektiv 11 und erreicht ein Fluoreszenz-Objekt 12, das auf einen Objektisch 13 aufgelegt ist.

Die von dem Anregungsfilter 9 erzeugten Anregungsbänder im Beleuchtungsstrahlengang werden durch Fluoreszenz-Farbstoffe, die in das Fluoreszenz-Objekt 12 eingebracht wurden, in Fluoreszenzbänder umgesetzt und
10 diese von dem Fluoreszenz-Objekt 12 frequenzverschoben emittiert. Dieses Fluoreszenzlicht durchläuft das Objektiv 11, den Strahlteiler 10, ein Ausgangsfilter 14, eine Tubuslinse 15 und erreicht eine Zwischenbildebene 16. Das hier erzeugte Zwischenbild kann von einem Mikroskop-Anwender mit einem Okular 17 betrachtet werden. Über einen TV-Ausgang wird das Zwischenbild zusätzlich auf eine Videokamera 18 mit nachgeschaltetem Bildanalyse-System 19 abgebildet. Mit diesem Aufbau können sowohl visuell über das
15 Okular 17 oder mithilfe des Bildanalyse-Systems 19 die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild bestimmt und mit Intensitäts-Sollwerten größer oder gleich Null verglichen werden.
20

Zur Dämpfung der Anregungsbänder ist erfindungsgemäß ein Filterschiebersatz 20, in diesem Beispiel bestehend aus zwei Filterschiebern 21a und 21b, senkrecht zur optischen Achse 2 des Beleuchtungsstrahlengangs dicht neben, d.h. hinter bzw. vor, der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht. Auf jedem Filterschieber 21a, 21b sind eine freie Öffnung 22 und daneben mehrere auf die Anregungsbänder abgestimmte, selektive Filter 23 angeordnet. Durch eine möglichst enge Anordnung der Filterschieber 21a, 21b wird erreicht, daß die Filter 23 möglichst dicht neben der Aperturblendenebene 24 liegen. Dadurch wird sichergestellt, daß die eingeschobenen Filterschieber 21a, 21b nicht im Bild sichtbar werden. Ein weiterer
25 Vorteil ist, daß hier die geringste Strahlaufweitung auftritt, so daß die Flächen der Filter 23 möglichst klein gehalten werden können.
30

Erfindungsgemäß sind jedem Filterschieber Verstellmittel zugeordnet. Dabei sind in preiswerteren Ausführungsformen auch Verstellmittel mit manueller Verstellmöglichkeit einsetzbar. Motorische Verstellmittel sind zwar teurer, erlauben jedoch eine Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

- 5 In dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel sind als Verstellmittel für die Filterschieber 21a, 21b zwei Motoren 25a, 25b angeordnet, welche die Filterschieber 21a, 21b parallel zur Aperturblendenebene 24 verschieben und/oder drehen können. Mittels der Motoren 25a, 25b kann von dem jeweils zugeordneten Filterschieber 21a bzw. 21b entweder die freie Öffnung 22 oder ein selektives Filter 23 oder eine Kombination aus beiden in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Die Motoren 25a, 25b werden von einer Steuer-
10 elektronik 26 angesteuert, die ihr Eingangssignal von dem Bildanalyse-System 19 erhält.

- Das Bildanalyse-System 19 ermittelt aus dem Kamera-Signal die Abweichung
15 der Fluoreszenz-Intensitäten von ihren Sollwerten. Dann werden diejenigen Anregungsbänder, welche die Sollwert-Abweichungen verursachen, bestimmt und jedem dieser Anregungsbänder wird zur Dämpfung einer der Filterschieber 21a, 21b zugeordnet. In dem dargestellten Beispiel können somit zwei Anregungsbänder vollständig, also auf den Wert Null, oder auch teilweise ge-
20 dämpft werden. Für jeden Filterschieber 21a, 21b wird ein Ansteuersignal für die zugehörigen Motoren 25a, 25b erzeugt. Jeder Filterschieber 21a, 21b wird mittels des zugehörigen Motors 25a, 25b stufenlos so verschoben, daß ein auf das zugeordnete Anregungsband selektiv wirksames Filter 23 in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht wird. Dann wird der Filterschieber 21a bzw. 21b
25 weiter verschoben, bis ein Flächenbereich des eingefügten Filters 23 mit einem solchen Transmissionsgrad im Beleuchtungsstrahlengang ist, durch den das zugeordnete Anregungsband auf den Intensitäts-Sollwert gedämpft wird. Auf diese Weise werden alle Anregungsbänder auf ihre Intensitäts-Sollwerte eingestellt.

Nachfolgend werden verschiedene Ausgestaltungen des Filterschieber-Satzes 20 bzw. der Filterschieber 21 und die dazugehörigen spektralen Transmissionsverläufe der darauf angeordneten Filter erläutert.

In **Fig. 2a** ist ein Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Langpaß-Filter 29 zur Intensitäts-Reduzierung des kurzwelligen Anregungsbandes A und ein Kurzpaß-Filter 28 zur Intensitäts-Reduzierung des langwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht. Sie befinden sich an den Enden der Glasplatte 27, dazwischen liegt in der Mitte des Filterschiebers 21 die freie Öffnung 22. Deren Querschnitt ist gleich dem Strahldurchmesser x in der Aperturblende 5 des Beleuchtungsstrahlengangs. Durch hier nicht dargestellte Verstellmittel kann der Filterschieber 21 in Längsrichtung in beiden Richtungen parallel zur Aperturblendenebene 24 stufenlos verschoben werden. Die Bewegung ist durch einen Doppelpfeil angedeutet.

Das Kurzpaß-Filter 28 und das Langpaß-Filter 29 sind in dieser Ausführung jeweils als zusammenhängende Aufdampfschicht aufgebracht. Die Transmission der beiden Filter 28, 29 ist direkt neben der freien Öffnung 22 am größten und nimmt mit dem Abstand von der freien Öffnung 22 ab. Dazu ist neben der freien Öffnung 22 der Filterschieber 21 nicht vollflächig mit den Filtern 28, 29 belegt, sondern der Anteil der Filterflächen nimmt von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 zu.

So bilden die Aufdampfschichten an den Enden des Filterschiebers 21 ein Rechteck mit einer Mindestkantenlänge gleich dem Strahldurchmesser x . Wenn diese aufgedampfte Rechteck-Fläche den Beleuchtungsstrahlengang vollflächig abdeckt, ist damit der geringste prozentuale Transmissionsgrad eingestellt und das zugehörige Anregungsband wird vollständig, also auf den Wert Null, gedämpft. An die aufgedampfte Rechteck-Fläche grenzt die Basis einer aufgedampften Dreieck-Fläche, dessen gegenüberliegende Ecke gegen die freie Öffnung 22 weist.

Durch die aufgedampften Dreieck-Flächen, die den Strahldurchmesser stets nur anteilig überdecken, nimmt der Transmissionsgrad des Kurzpaß-Filters 28 und des Langpaß-Filters 29 jeweils in Verschieberichtung von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 ab. Durch Einfügen eines beliebigen Flächenanteils des Kurzpaß-Filters 28 oder des Langpaß-Filters 29 läßt sich jeder gewünschte Transmissionsgrad der Filter 28, 29 im Beleuchtungsstrahlengang realisieren und damit das eine oder das andere Anregungsband beliebig abschwächen oder ausblenden.

In **Fig. 2b** ist ebenfalls ein Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multi-band-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Kurzpaß-Filter 28 zur Filterung des langwelligen Anregungsbandes A und ein Langpaß-Filter 29 zur Filterung des kurzwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht.

Auch hier weisen, wie in **Fig. 2a**, die Aufdampfschichten in Richtung der freien Öffnung 22 eine dreieckige Kontur auf. Allerdings sind hier die Dreiecke jeweils nicht als zusammenhängende Fläche, sondern als kleine, gleich große Flächenelemente 30 aufgedampft. Dadurch ergibt sich für die beiden Filter 28, 29 ein längerer Verstellbereich mit höheren Transmissionen. An den Enden des Filterschiebers 21 bilden die Aufdampfschichten ein Rechteck mit einer Mindestkantenlänge gleich dem Strahldurchmesser x und damit einen Bereich der geringsten Transmission, mit dem das zugeordnete Anregungsband auf Null gedämpft werden kann.

In **Fig. 2c** ist ein weiterer Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multi-band-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Kurzpaß-Filter 28 zur Filterung des langwelligen Anregungsbandes A und ein Langpaß-Filter 29 zur Filterung des kurzwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht. Dazwischen befindet sich eine freie Öffnung 22.

Die Filter 28, 29 sind in dieser Ausführung des Filterschiebers 21 neben der freien Öffnung 22 als separate, beliebig geformte (hier kreisförmige) Flä-

chenelemente 30 aufgedampft. Dabei nimmt die Größe der Flächenelemente 30 und damit der Anteil der bedampften Fläche des Filterschiebers 21 von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 zu. Neben der freien Öffnung 22 ist der Transmissionsgrad der Filter 28, 29 am größten und nimmt
5 in Verschieberichtung zu den Enden des Filterschiebers 21 ab. An den beiden Enden des Filterschiebers 21 weisen die beiden Filter 28, 29 jeweils eine vollflächig bedampfte Fläche mit dem geringsten Transmissionsgrad auf, die mindestens den Durchmesser x der Strahlengangs hat.

In **Fig. 2d** ist ebenfalls ein Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multi-
10 band-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Kurzpaß-Filter 28 zur Filterung des langwelligen Anregungsbandes A und ein Langpaß-Filter 29 zur Filterung des kurzwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht. Dazwischen befindet sich eine freie Öffnung 22.

15 In dieser Ausführungsform sind die Aufdampfschichten als streifenförmige Flächenelemente 30 aufgebracht, wobei die Breite der Streifen von der Mitte zu den Enden des Filterschiebers 21 zunimmt. Dadurch nimmt die Transmission in Verschieberichtung von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 ab. Auch hier weisen die beiden Filter 28, 29 an den beiden En-
20 den des Filterschiebers 21 jeweils eine vollflächig bedampfte Fläche mit dem geringsten Transmissionsgrad auf, die mindestens den Durchmesser x der Strahlengangs hat.

In **Fig. 2e** sind in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge λ die spektralen Transmissionskurven der kurzwelligen Anregungsbandes A und des langwelli-
25 gen Anregungsbandes D sowie die Transmissionskurven T_A , T_D der zugehörigen selektiven Filter, also des Langpaß-Filters für das kurzwellige Anregungsband A und des Kurzpaß-Filters für das langwellige Anregungsband D, dargestellt. Die Filter A und B sind so ausgewählt, daß sie nur selektiv das jeweils zugehörige Anregungsband ausfiltern, jedoch die übrigen Wellenlängenberei-
30 che ungehindert durchlassen.

Fig. 3a zeigt einen rechteckigen Filterschieber 21 eines zweiteiligen Filterschieber-Satzes 20 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit drei Anregungsbändern A, B, D. In dieser Ausführungsform besteht der Filterschieber-Satz 20 aus zwei identischen dieser rechteckigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden.

In der Mitte des Filterschiebers 21 ist die freie Öffnung 22 mit dem Durchmesser x des Beleuchtungsstrahlengangs 2 vorgesehen. An den beiden Enden des Filterschiebers 21 sind zwei unterschiedliche Kombinationen aus jeweils zwei der drei selektiven Filter 28, 29, 31 für die Anregungsbänder A, B, D als Aufdampfschichten aufgebracht. Die beiden Filter 28, 31 bzw. 29, 31 an einem Ende sind jeweils so nebeneinander angeordnet, daß beide Filter aneinander und an die freie Öffnung 22 angrenzen. Jedes Filter 28, 29, 31 weist dabei einen Bereich der geringsten Transmission mit mindestens dem Durchmesser x des Beleuchtungsstrahlengangs 2 auf. Dadurch besitzt der Filterschieber 21 an seinem kurzen Ende mindestens eine Breite von $2x$.

Der Transmissionsgrad der Filter 28, 29, 31 nimmt in der Längsrichtung des Filterschiebers 21, also in der Verschieberichtung, von der freien Öffnung 22 zu den Enden ab. Dies ist in dem hier dargestellten Beispiel realisiert, indem die aufgedampfte Fläche jedes Filters 28, 29, 31 jeweils von der freien Öffnung 22 zum Ende des Filterschiebers 21 zunimmt.

Für jeden der beiden identischen Filterschieber 21 des Filterschieber-Satzes sind separate Verstellmittel 25 zum Verschieben des Filterschiebers 21 parallel zur Aperturblendenebene 24 sowohl in Längsrichtung als auch in Querrichtung vorgesehen. Dadurch ist es möglich, die Filter 28, 29, 31 einzeln oder kombiniert, vollflächig oder mit nur einem Teil ihrer Fläche in den Beleuchtungsstrahlengang einzubringen.

Fig. 3b zeigt einen kreisförmigen Filterschieber 21 eines zweiteiligen Filterschieber-Satzes 20 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit drei Anregungsbändern A, B, D. In dieser vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops be-

steht der Filterschieber-Satz 20 aus zwei identischen dieser kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden. Auf jedem Filterschieber 21 ist die freie Öffnung 22 in der Mitte vorgesehen. Daran angrenzend sind als
5 aneinander angrenzende, aufgedampfte Kreisringsektoren drei selektive Filter 28, 29, 31 für die Anregungsbänder A, B, D angeordnet.

Die Filter 28, 29, 31 besitzen jeweils einen radial abnehmenden Transmissionsgrad, der neben der freien Öffnung 22 am größten ist. Dies wird beispielsweise dadurch erzielt wird, daß die Filter 28, 29, 31 nicht vollflächig aufgedampft werden. Statt dessen sind neben der freien Öffnung 22 radial breiter zulaufende, aufgedampfte Flächenelemente 30 mit unbedampften Flächenbereichen dazwischen aufgebracht, so daß der Anteil der bedampften Fläche jedes Filters 28,29,31 radial zunimmt.
10

Mittels separater Verstellmittel (hier nicht dargestellt) kann jeder der beiden identischen Filterschieber 21 des Filterschieber-Satzes 20 einzeln und parallel zur Aperturblendenebene 24 verschoben werden. Er kann dabei entweder lateral in einer Richtung verschoben und zusätzlich gedreht werden (wie in der **Fig. 3b** angedeutet) oder alternativ in einer Ebene in zwei Richtungen verschoben werden. Dadurch kann jeder beliebige Flächenanteil des Filterschiebers 21, also z.B. die freie Öffnung 22 oder eines der Filter 28, 29, 31 mit dem gewünschten Transmissionsgrad, in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Durch die Anordnung zweier gleicher Filterschieber 21 im Beleuchtungsstrahlengang können zwei beliebige der drei Filter 28, 29, 31 gleichzeitig in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden, so daß zwei
20 der drei Anregungsbänder gleichzeitig auf die vorbestimmten Sollwerte abgeschwächt bzw. sogar ganz ausgeblendet werden können.
25

Fig. 3c zeigt eine besonders vorteilhafte Ausführungsform eines Filterschiebers 21 für einen zweiteiligen Filterschieber-Satz 20 eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops mit drei Anregungsbändern A, B, D. In
30 dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus zwei identischen dieser

kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturbblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden.

Die Filter 28, 29, 31 für die Anregungsbänder A, B, D sind auf dem Filterschieber 21 so vorteilhaft angeordnet, daß er nur gedreht, aber nicht verschoben werden muß (Drehbewegung ist angedeutet). Das vereinfacht den Aufbau der mechanischen oder auch motorischen Verstellmittel, die jedem der beiden Filterschieber 21 separat zugeordnet sind (hier nicht dargestellt).

Um dies zu erreichen, ist jeder Filterschieber 21 kreisförmig aufgebaut, in sechs Sektoren gegliedert und um seine Mitte drehbar gelagert. Die Kreismitte liegt außerhalb des Beleuchtungsstrahlengangs. Jeder Sektor kann durch Drehen des Filterschiebers 21 in den Beleuchtungsstrahlengang eingeschwenkt werden und ihn voll abdecken. Der Strahlquerschnitt mit dem Durchmesser x ist eingezeichnet.

Jeder zweite Sektor ist eine freie Öffnung 22. Dazwischen ist jeweils eines der drei Filter 28, 29, 31 für die drei Anregungsbänder A, B, D aufgebracht, z.B. aufgeklebt oder aufgedampft. Jedes Filter 28, 29, 31 weist innerhalb seines Kreissektors in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads, beispielsweise durch unterschiedliche Flächenbelegung mit aufgedampften Flächenelementen, auf. Dadurch besitzt jedes Filter 28, 29, 31 neben der einen benachbarten freien Öffnung 22 einen maximalen Transmissionsgrad und neben der anderen benachbarten freien Öffnung 22 einen minimalen Transmissionsgrad. Durch Drehen des Filterschiebers 21 kann eine der freien Öffnungen 22 oder eines der Filter 28, 29, 31 mit der gewünschten Transmission oder eine Kombination aus beiden in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Der Einsatz von zwei identischen Filterschiebern 21 als Filterschieber-Satz ermöglicht es, bis zu zwei der drei Anregungsbänder A, B, D gleichzeitig und unabhängig von einander auf den gewünschten Sollwert zu dämpfen.

Fig. 3d zeigt in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge λ die spektralen Transmissionskurven des kurzwelligen Anregungsbandes A, des langwelligen Anregungsbandes D und eines dazwischenliegenden Anregungsbandes B.

Weiterhin sind die Transmissionskurven T_A , T_B , T_D der zugehörigen selektiven Filter, also des Langpaß-Filters für das kurzwellige Anregungsband A, des Kurzpaß-Filters für das langwellige Anregungsband D und eines selektiven Filters für das Anregungsband B, dargestellt. Die Filter sind so ausgewählt,
5 daß sie nur selektiv das zugehörige Anregungsband ausfiltern, jedoch die übrigen Wellenlängenbereiche ungehindert durchlassen.

Fig. 4a zeigt einen kreisförmigen Filterschieber 21 für einen dreiteiligen Filterschieber-Satz 20 eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops mit vier Anregungsbändern A, B, C, D. In dieser Ausführungsform
10 des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus drei identischen dieser kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden. Jeder Filterschieber 21 weist in der Mitte eine freie Öffnung 22 auf. Daneben sind als aneinander angrenzende
15 Kreisringsektoren vier selektive Filter 28, 29, 31, 32 für die Anregungsbänder A, B, C, D aufgedampft.

Der Transmissionsgrad der Filter 28, 29, 31, 32 nimmt radial ab und ist neben der freien Öffnung 22 am größten. Dies wird beispielsweise dadurch erzielt, daß die Filter 28, 29, 31, 32 nicht vollflächig, sondern als ringförmige Flächenelemente 30 mit unbedampften Flächen dazwischen aufgedampft werden, wodurch der Anteil der bedampften Fläche jedes Filters 28, 29, 31, 32
20 radial zunimmt.

Jedem der drei Filterschieber 21 des Filterschieber-Satzes 20 sind separate Verstellmittel (hier nicht dargestellt) zugeordnet. Mithilfe dieser Verstellmittel
25 kann jeder Filterschieber 21 einzeln und parallel zur Aperturblendenebene 24 verschoben werden. Er kann dabei entweder lateral in einer Richtung verschoben und zusätzlich gedreht werden (wie in der **Fig. 4a** angedeutet) oder alternativ in einer Ebene in zwei Richtungen verschoben werden.

Dadurch kann jeder beliebige Flächenanteil des Filterschiebers 21, also z.B.
30 die freie Öffnung 22 oder ein beliebiger Flächenanteil der Filter 28, 29, 31, 32, in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Durch die Anordnung

von drei gleichen Filterschiebern 21 im Beleuchtungsstrahlengang können drei beliebige der vier Filter 28, 29, 31, 32 gleichzeitig in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden. Damit können gleichzeitig bis zu drei der vier Anregungsbänder A, B, C, D auf die vorbestimmten Sollwerte abgeschwächt bzw. sogar ganz ausgeblendet werden.

Fig. 4b zeigt eine besonders vorteilhafte Ausführungsform eines Filterschiebers 21 für einen dreiteiligen Filterschieber-Satz 20 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit vier Anregungsbändern A, B, C, D. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus drei identischen dieser kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblende 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden.

Die Filter 28, 29, 31, 32 für die Anregungsbänder A, B, C, D sind auf dem Filterschieber 21 so vorteilhaft angeordnet, daß er nur gedreht, aber nicht verschoben werden muß (Drehbewegung ist angedeutet). Das vereinfacht den Aufbau der mechanischen oder auch motorischen Verstellmittel, die jedem der drei Filterschieber 21 separat zugeordnet sind (hier nicht dargestellt).

Dies wird dadurch erzielt, daß jeder Filterschieber 21 kreisförmig aufgebaut, in acht Sektoren gegliedert und um seine Mitte drehbar gelagert ist. Die Kreismitte liegt außerhalb des Beleuchtungsstrahlengangs. Durch Drehen des Filterschiebers 21 kann jeder Sektor ganz oder teilweise mit dem Beleuchtungsstrahlengang zur Deckung gebracht werden. Der Strahlquerschnitt mit dem Durchmesser x ist eingezeichnet.

Jeder zweite Sektor ist eine freie Öffnung 22. Dazwischen ist jeweils eines der vier Filter 28, 29, 31, 32 für die drei Anregungsbänder A, B, C, D aufgebracht, z.B. aufgeklebt oder aufgedampft. Jedes Filter 28, 29, 31, 32 weist innerhalb seines Kreissektors in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads, beispielsweise durch unterschiedliche Flächenbelegung, auf. Dadurch besitzt jedes Filter 28, 29, 31, 32 neben der einen benachbarten freien Öffnung 22 einen maximalen Transmissionsgrad und neben der anderen benachbarten freien Öffnung 22 einen minimalen Transmissionsgrad.

Durch Drehen des Filterschiebers 21 kann eine der freien Öffnungen 22 oder eines der Filter 28, 29, 31, 32 mit der gewünschten Transmission oder eine Kombination aus beiden in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Durch den Einsatz von drei Filterschiebern 21 können bis zu drei der vier
5 Anregungsbänder A, B, C, D gleichzeitig und unabhängig von einander auf den gewünschten Sollwert gedämpft werden.

In **Fig. 4c** sind in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge λ die spektralen Transmissionskurven der kurzwelligen Anregungsbandes A, des langwelligen Anregungsbandes D und zweier dazwischen liegender Anregungsbänder B
10 und C dargestellt. Weiterhin sind die Transmissionskurven T_A , T_B , T_C , T_D der zugehörigen selektiven Filter, also des Langpaß-Filters für das kurzwellige Anregungsband A, des Kurzpaß-Filters für das langwellige Anregungsband D, eines selektiven Filters für das Anregungsband B und eines selektiven Filters für das Anregungsband C, angegeben. Die Filter A, B, C, D sind so ausge-
15 wählt, daß sie nur selektiv das jeweils zugehörige Anregungsband ausfiltern, jedoch die übrigen Wellenlängenbereiche ungehindert durchlassen.

Für mehr als vier Anregungsbänder muß der Filterschieber-Satz 20 entsprechend erweitert werden. Allerdings wird es dann zunehmend schwieriger, die einzelnen Filter nahe genug neben der Aperturblende 5 unterzubringen.

Bezugszeichenliste

- 1 Lichtquelle
- 2 optische Achse des Beleuchtungsstrahlengangs
- 3 Kollektor
- 4 erstes Linsenglied
- 5 Aperturblende
- 6 zweites Linsenglied
- 7 Leuchtfeldblende
- 8 drittes Linsenglied
- 9 Anregungsfilter
- 10 Strahlteiler
- 11 Objektiv
- 12 Fluoreszenz-Objekt
- 13 Objektisch
- 14 Ausgangsfilter
- 15 Tubuslinse
- 16 Zwischenbildebene
- 17 Okular an Tubus (17')
- 18 Videokamera
- 19 Bildanalyse-System
- 20 Filterschieber-Satz
- 21 Filterschieber (auch 21a, 21b)
- 22 freie Öffnung
- 23 selektive(s) Filter
- 24 Aperturblendenebene
- 25 Verstellmittel (25a, 25b Motoren)
- 26 Steuerelektronik
- 27 Glasplatte
- 28 Kurzpaß-Filter für das langwellige Anregungsband $D(\lambda_4)$
- 29 Langpaß-Filter für das kurzwellige Anregungsband $A(\lambda_1)$
- 30 Flächenelement(e)
- 31 subtraktives Filter zu Anregungsband $B(\lambda_2)$
- 32 subtraktives Filter zu Anregungsband $C(\lambda_3)$
- x Strahldurchmesser in der Aperturblendenebene 24

Ansprüche

1. Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit mehreren spektral verschiedenen Anregungsbändern, die von einem Fluoreszenz-Objekt (12) gleichzeitig
5 in Fluoreszenzbänder mit Fluoreszenz-Intensitäten umgesetzt werden,
dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild bestimmt und mit Intensitäts-Sollwerten größer oder gleich Null verglichen werden,
 - 10 b) für jedes Anregungsband, das einer von den Intensitäts-Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, ein selektives Filter (23; 28, 29, 31, 32) in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht wird,
 - c) und die im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der einzelnen Filter (23; 28, 29, 31, 32) stufenlos so eingestellt werden,
15 daß durch Dämpfung der zugehörigen Anregungsbänder alle Fluoreszenz-Intensitäten auf ihre Intensitäts-Sollwerte eingestellt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Sollwerte für die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten alle gleich der
20 niedrigsten Fluoreszenz-Intensität sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
mindestens einer der Sollwerte für die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten gleich Null ist.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
für einige Fluoreszenz-Intensitäten die Sollwerte gleich Null sind und für die übrigen gleich der niedrigsten Fluoreszenz-Intensität sind.

5. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten visuell bestimmt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1,
5 **dadurch gekennzeichnet, daß**
die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten mit einem Intensitätsmesser bestimmt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
10 die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten mittels einer CCD- oder einer Video-Kamera (18) mit nachgeschaltetem Bildanalyse-System (19) bestimmt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
15 a) Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten fortlaufend bestimmt werden,
b) und durch wiederholte Anpassung der im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der Filter (23; 28, 29, 31, 32) die Fluoreszenz-Intensitäten stets wieder auf ihre Sollwerte gebracht werden.
- 20 9. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
a) Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten automatisch fortlaufend bestimmt werden,
b) und durch automatisch fortlaufende Anpassung der im Beleuchtungs-
25 strahlengang wirksamen Transmissionsgrade der Filter (23, 28, 29, 31, 32) die Fluoreszenz-Intensitäten stets auf ihren Sollwerten gehalten werden.

10. Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Ausübung des Verfahrens nach Anspruch 1, enthaltend einen Beleuchtungsstrahlengang mit einer Lichtquelle (1), einem Kollektor (3), mehreren Linsengliedern (4, 6, 8), einer Aperturblende (5), einer Leuchtfeldblende (7), einem Anregungsfilter (9)
5 zur gleichzeitigen Erzeugung mehrerer Anregungsbänder unterschiedlicher Lichtwellenlängen sowie einem Filterelement zur Beeinflussung dieser Anregungsbänder, ferner enthaltend einen Strahlteiler (10) und ein Objektiv (11), das den Beleuchtungsstrahl auf ein auf einem Objekttisch (13) liegendes Fluoreszenz-Objekt (12) richtet, welches über den Strahlteiler (10), ein Ausgangsfilter (14) und eine Tubuslinse (15) in eine Zwischenbildebene (16) abgebildet wird,
10 **dadurch gekennzeichnet, daß**
- a) als Filterelement ein Filterschieber-Satz (20) aus einzeln verschiebbaren, dicht beabstandeten Filterschiebern (21; 21a, 21b) dicht neben der Aperturblende (5) senkrecht in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt ist,
15
 - b) auf jedem Filterschieber (21) für jedes Anregungsband ein selektives Filter (23; 28, 29, 31, 32) vorgesehen ist, das Flächenbereiche mit hohen und niedrigen Transmissionsgraden aufweist,
 - 20 c) zum vollständigen Löschen des Anregungsbandes der Flächenbereich mit dem niedrigsten Transmissionsgrad einen Minstdurchmesser gleich dem Strahldurchmesser (x) aufweist,
 - d) neben jedem Filter (23; 28, 29, 31, 32) eine freie Öffnung (22) mit dem Strahldurchmesser (x) angeordnet ist,
 - 25 e) der Transmissionsgrad jedes Filters (23; 28, 29, 31, 32) in Verschieberichtung mit dem Abstand von der freien Öffnung (22) abnimmt,
 - f) und jedem Filterschieber (21) separate Verstellmittel (25) zugeordnet sind, mit denen ein beliebiger Flächenbereich des Filterschiebers (21) in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden kann.

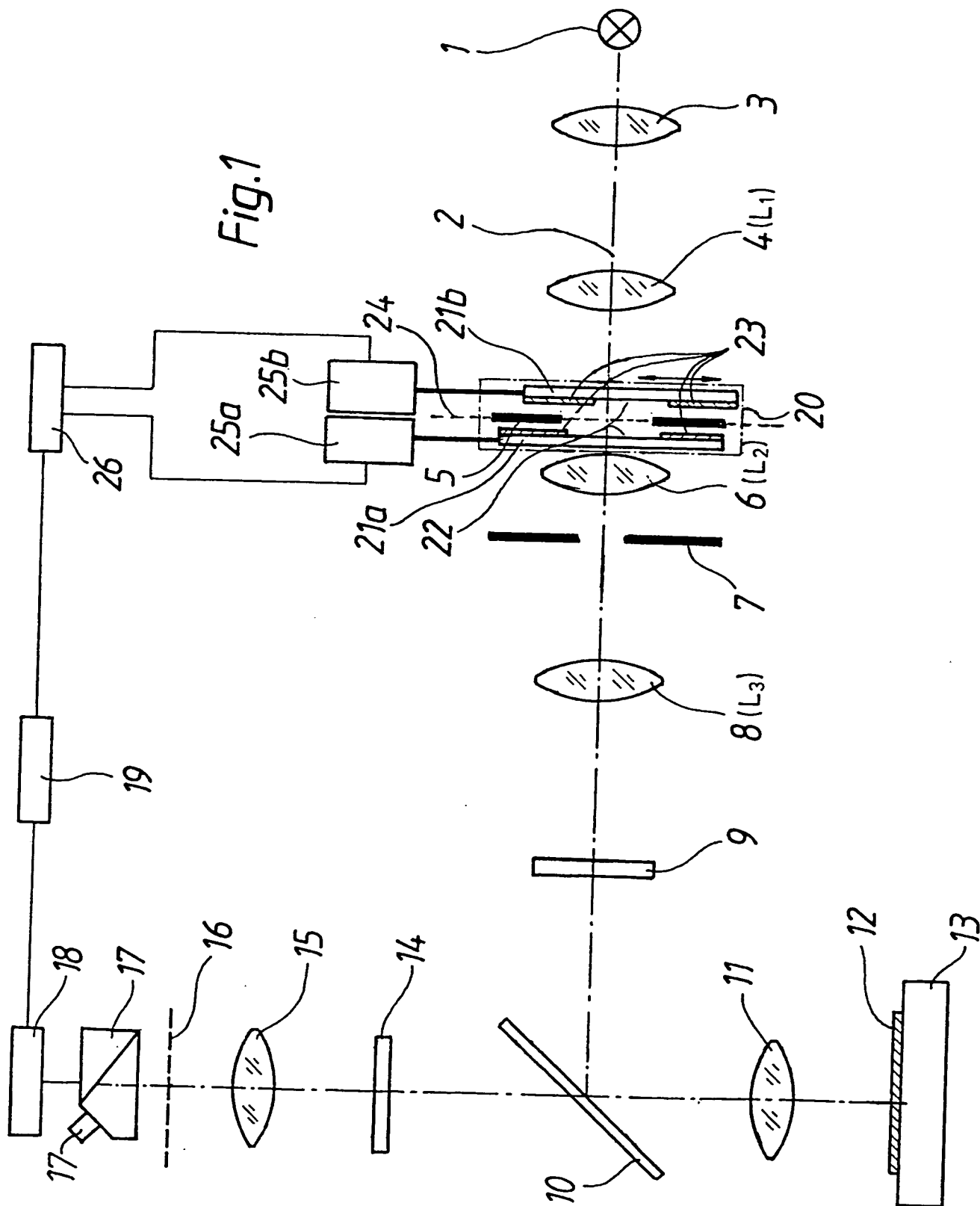
11. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
zur Beeinflussung einer Anzahl n Anregungsbänder
- 5 a) der Filterschieber-Satz (20) aus $n-1$ Filterschiebern (21) auf separaten,
dicht beabstandeten $n-1$ Schiebe-Ebenen parallel zur Aperturblenden-
ebene (24) besteht,
- b) jeder Filterschieber (21) mindestens eine freie Öffnung (22) und n selektive Filter (23; 28, 29, 31, 32) für die n Anregungsbänder aufweist.
12. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
- 10 zur Beeinflussung zweier Anregungsbänder A, D ein einzelner Filterschieber (21) vorgesehen ist,
- a) der an seinem einen Ende ein Langpaß-Filter (29) zur Intensitätsabschwächung des kürzerwelligen Anregungsbandes A,
- 15 b) an seinem anderen Ende ein Kurzpaß-Filter (28) zur Intensitätsabschwächung des längerwelligen Anregungsbandes D,
- c) und dazwischen die freie Öffnung (22) aufweist,
- d) sowie Verstellmittel (25) zum kontinuierlichen Verschieben des Filterschiebers (21) parallel zur der Aperturblendenebene (24) angebracht
- 20 sind.
13. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
- a) der Filterschieber (21) eine lichtdurchlässige, rechteckige Glasplatte (27) aufweist, an deren Enden einander gegenüberliegend das Kurzpaß-Filter (28) und das Langpaß-Filter (29) als Aufdampfschichten aufgebracht sind,
- 25 b) und das Kurzpaß-Filter (28) und das Langpaß-Filter (29) jeweils in Verschieberichtung von der freien Öffnung (22) zu den Enden des Filterschiebers (21) einen zunehmenden Anteil der bedampften Glasoberfläche und dadurch eine abnehmende Transmission aufweist.
- 30

14. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Flächen der beiden Aufdampfschichten an den Enden des Filterschiebers (21) jeweils die Form eines Rechtecks mit einer Mindestkantenlänge
5 gleich dem Strahldurchmesser (x) haben, dem in Richtung der freien Öffnung (22) die Basis einer aufgedampften, gleichschenkligen Dreiecks-
Fläche angrenzt.
15. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, daß
10 die Aufdampfschichten ganz oder teilweise als nicht zusammenhängende Fläche, sondern als Flächenelemente (30) aufgebracht sind, deren Größe
oder Abstände in Verschieberichtung von der freien Öffnung (22) zu den
Enden hin unterschiedlich gewählt sind.
16. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
15 **dadurch gekennzeichnet, daß**
zur Beeinflussung von drei Anregungsbändern A, B, D ein zweiteiliger
Filterschieber-Satz (20) aus zwei kreisförmigen Filterschiebern (21) vor-
gesehen ist, wobei
- 20 a) jeder Filterschieber (21) eine kreisförmige freie Öffnung (22) in der
Mitte aufweist,
- b) darum herum als drei Kreisringsektoren drei selektive Filter (28, 29, 31)
für die Anregungsbänder A, B, D mit radial abnehmendem Transmissi-
onsgrad angeordnet sind,
- 25 c) und jedem Filterschieber (21) separate Verstellmittel (25) zugeordnet
sind, mit denen die Filterschieber (21) unabhängig voneinander parallel
zur Aperturblendenebene (24) verschoben und/oder gedreht werden
können.
17. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet, daß
30 zur Erzielung eines radial abnehmenden Transmissionsgrads der Anteil
der bedampften Fläche der Filter (28, 29, 31) radial zunimmt.

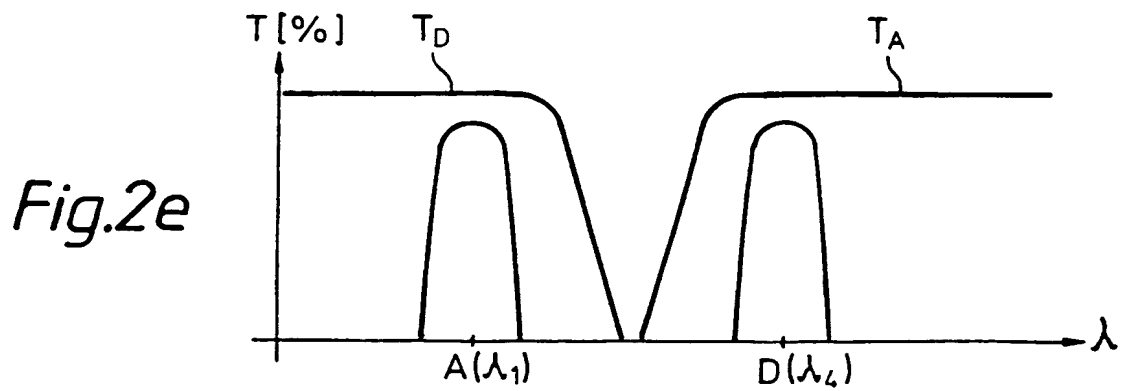
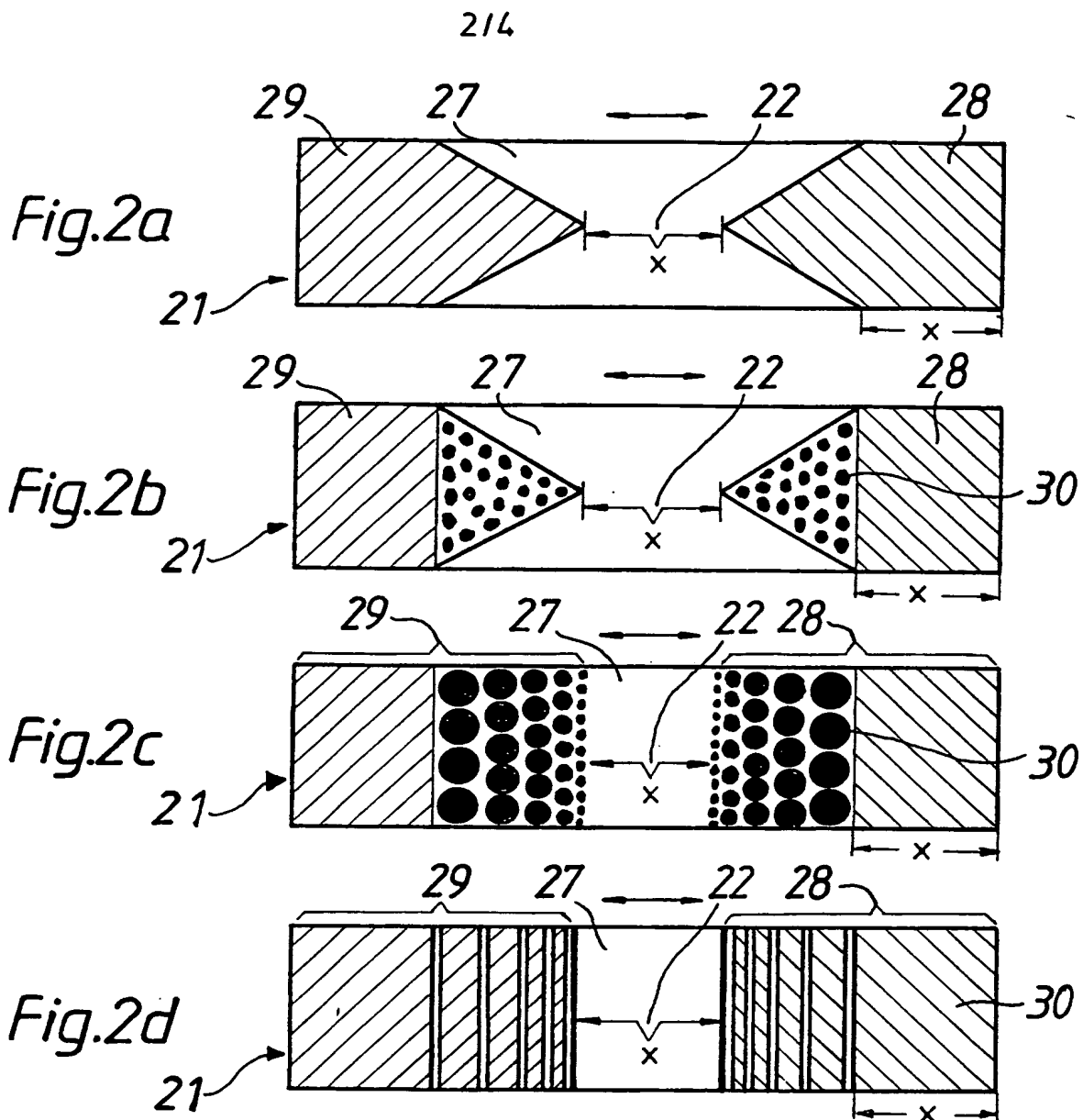
18. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
zur Beeinflussung von drei Anregungsbändern A, B, D ein zweiteiliger
Filterschieber-Satz (20) aus zwei kreisförmigen Filterschiebern (21) vor-
gesehen ist, wobei
- 5
- a) jeder Filterschieber (21) in sechs, den Beleuchtungsstrahlengang ab-
deckende Kreissektoren gegliedert und um seine außerhalb des
Strahlengangs gelegene Mitte drehbar gelagert ist,
- b) jeder zweite Kreissektor eine freie Öffnung (22) ist und dazwischen je-
weils eines der drei selektiven Filter (28, 29, 31) für die Anregungsbän-
der A, B, D liegt,
- 10
- c) jedes Filter (28, 29, 31) in einer der beiden Drehrichtungen einen An-
stieg des Transmissionsgrads aufweist,
- d) und separate Verstellmittel (25) zum Drehen jedes Filterschiebers (21)
um seine Mitte und parallel zur Aperturblendenebene (24) vorgesehen
sind.
- 15
19. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
zur Beeinflussung von drei Anregungsbändern A, B, D ein zweiteiliger
Filterschieber-Satz (20) aus zwei rechteckigen Filterschiebern (21) vorge-
sehen ist, wobei
- 20
- a) jeder Filterschieber (21) in der Mitte eine freie Öffnung (22) und an sei-
nen beiden Enden zwei unterschiedliche Kombinationen aus jeweils
zwei der drei selektiven Filter (28, 29, 31) für die Anregungsbänder
aufweist,
- 25
- b) der Transmissionsgrad der Filter (28, 29, 31) in der Längsrichtung des
Filterschiebers (21) von der freien Öffnung (22) zu den Enden ab-
nimmt,
- c) und separate Verstellmittel (25) zum Verschieben des Filterschiebers
(21) in Längsrichtung und parallel zur Aperturblendenebene (24) ange-
ordnet sind.
- 30

20. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
zur Beeinflussung von vier Anregungsbändern A, B, C, D ein dreiteiliger
Filterschieber-Satz (20) aus drei kreisförmigen Filterschiebern (21) vorge-
5 sehen ist, wobei
- a) jeder Filterschieber (21) in der Mitte eine freie Öffnung (22) und darum
herum vier selektive Filter (28, 29, 31, 32) für die Anregungsbänder als
aneinander angrenzende, aufgedampfte Kreisringsektoren mit radial
abnehmendem Transmissionsgrad aufweist
- 10 b) und separate Verstellmittel (25) zum Verschieben und/oder Drehen je-
des Filterschiebers (21) parallel zur Aperturblendenebene (24) vorge-
sehen sind.
21. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
- 15 zur Beeinflussung von vier Anregungsbändern A, B, C, D ein dreiteiliger
Filterschieber-Satz (20) aus drei kreisförmigen Filterschiebern (21) vorge-
sehen ist, wobei
- a) jeder Filterschieber (21) in acht, den Beleuchtungsstrahlengang ab-
deckende Kreissektoren gegliedert und um seine außerhalb des
20 Strahlengangs gelegene Mitte drehbar gelagert ist,
- b) jeder zweite Kreissektor eine freie Öffnung (22) ist und dazwischen je-
weils eines der vier selektiven Filter (28, 29, 31, 32) für die Anregungs-
bänder liegt,
- c) jedes Filter (28, 29, 31, 32) in einer der beiden Drehrichtungen einen
25 Anstieg des Transmissionsgrads aufweist,
- d) und separate Verstellmittel (25) zum Drehen jedes Filterschiebers (21)
um seine Mitte und parallel zur Aperturblendenebene (24) vorgesehen
sind.

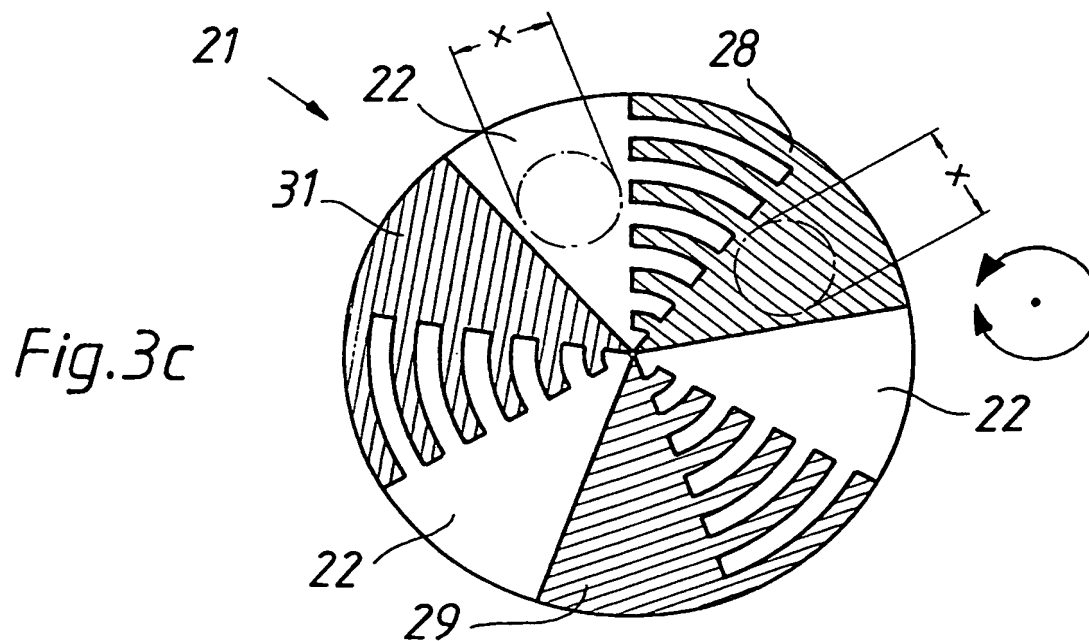
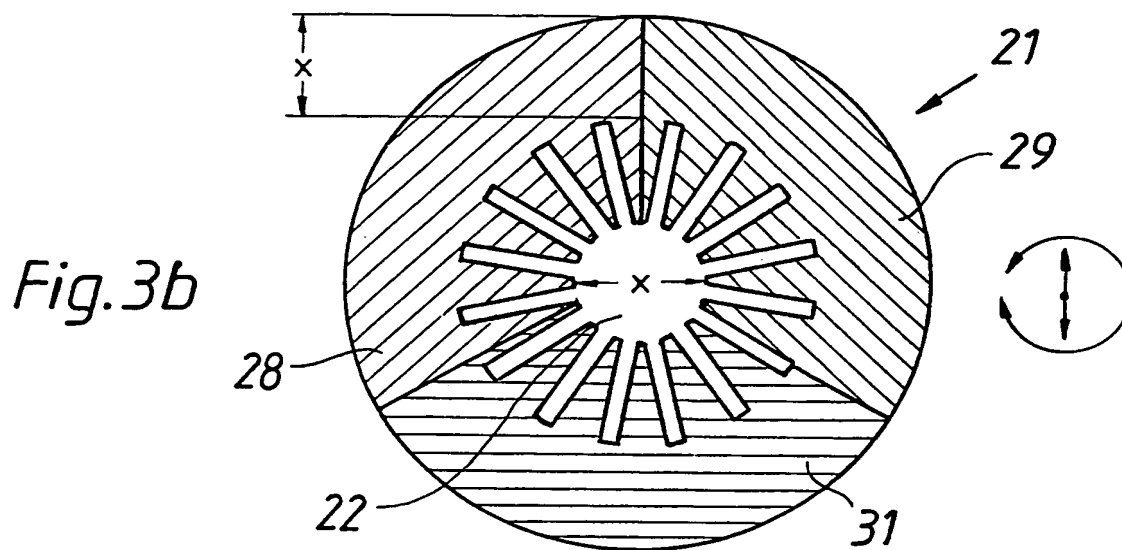
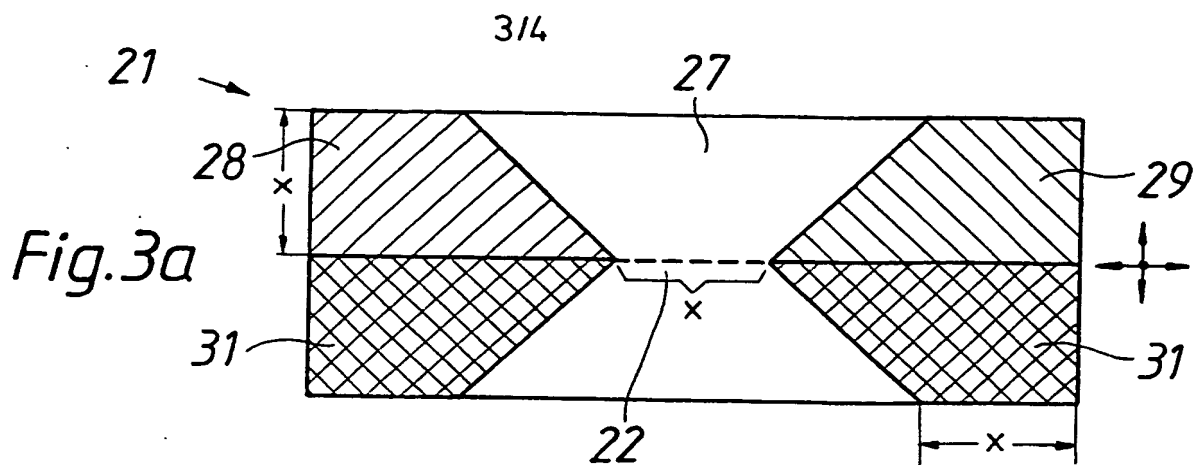
Fig.1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

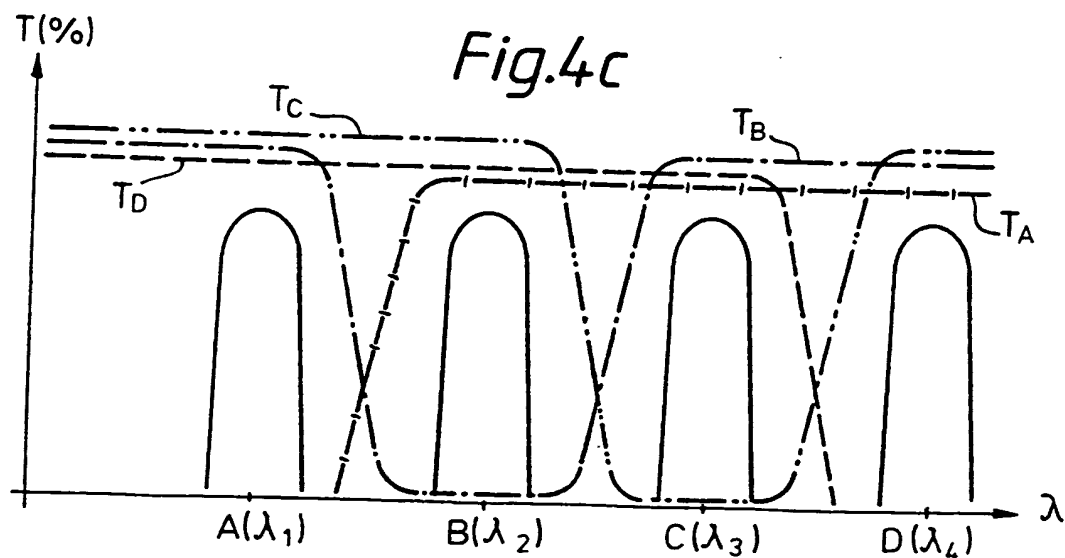
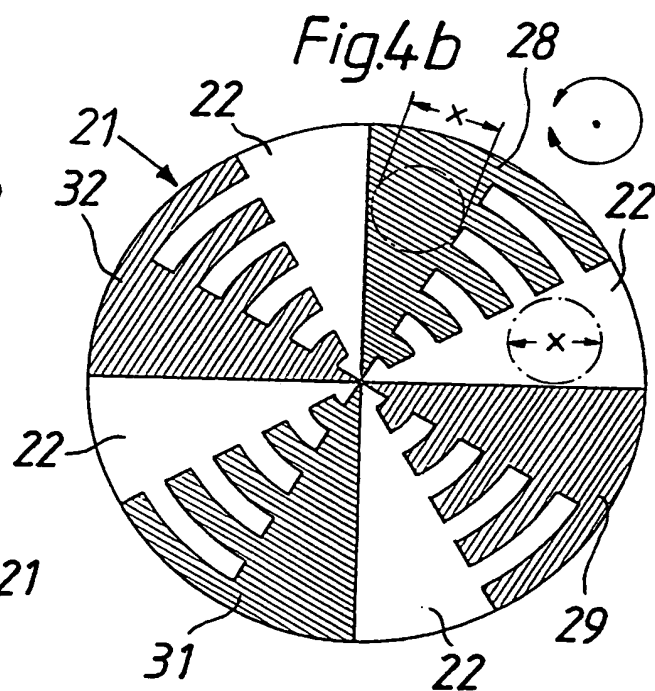
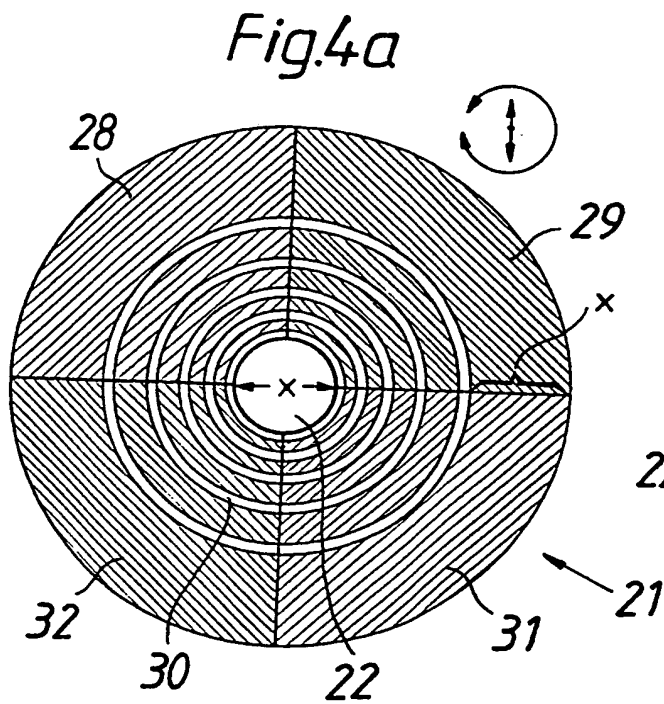
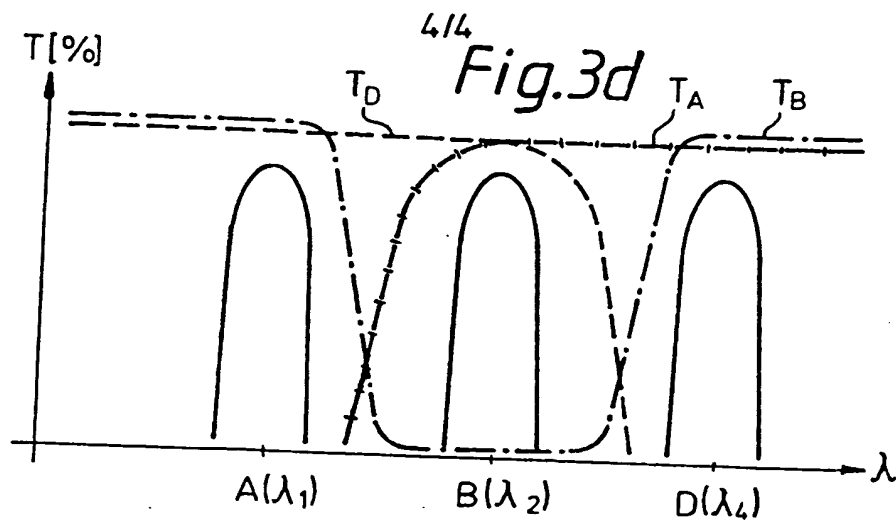


THIS PAGE BLANK (USPTO)





THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03768

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G02B21/16 G02B21/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 03, 28. April 1995 (1995-04-28) - & JP 06 331894 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 2. Dezember 1994 (1994-12-02)	1
A	Zusammenfassung	10
X	US 5 710 663 A (KAWASAKI KENJI) 20. Januar 1998 (1998-01-20)	1
A	Spalte 7, Zeile 27 - Zeile 44 Spalte 9, Zeile 48 - Spalte 10, Zeile 47 Abbildungen 4,7,8	10
A	WO 98 45744 A (NORTHERN EDGE ASSOCIATES INC ; RICHARDSON TIMOTHY M (CA)) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Seite 26, Zeile 6 - Zeile 19	10
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

4. April 2000

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

13/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Luck, W

26



THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>US 5 371 624 A (NAGANO TAKASHI ET AL) 6. Dezember 1994 (1994-12-06) in der Anmeldung erwähnt</p>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03768

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 06331894	A	02-12-1994	NONE		
US 5710663	A	20-01-1998	JP	8320437 A	03-12-1996
WO 9845744	A	15-10-1998	AU	7019798 A	30-10-1998
			EP	0978008 A	09-02-2000
US 5371624	A	06-12-1994	JP	5150164 A	18-06-1993
			JP	5188299 A	30-07-1993

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Express Mail Label No. EL 917291 338 US

LWEP:103_US_

Translation of International Application PCT/DE99/03768

Method for the Individual Adaptation of Excitation Intensities in a Multiband
Fluorescence Microscope and a Multiband Fluorescence Microscope for Carrying Out
Said Method

- 5 The invention relates to a method for the individual adaptation of excitation intensities in a multiband fluorescence microscope and a multiband fluorescence microscope to execute the method corresponding to the features of the introductory clause of the independent claims.
- 10 With the multiband fluorescence microscope, the user frequently confronts the problem that the different fluorescence bands in the microscopic image have varying intensities and are not uniformly visible. The cause lies frequently in the difference in excitation intensities in the illumination beam path or even in the varying blockage of the fluorescence intensities by a barrier filter in the imaging beam path. Also, different
- 15 concentrations of the fluorescence die for the different excitation bands, even when staining the objects to be considered, or the progressive bleaching of the dye, the so-called fading, lead to differing intensities of the fluorescence bands in the microscopic image. The different intensities of the fluorescence bands prove to be especially problematic then if the microscopic image is to be photographically recorded. Then the
- 20 portion of the fluorescent light of weak intensity on the photo is too weakly reproduced or is not visible at all. Only with intensities of the fluorescence bands that are as uniform as possible can there be defect-free photos of the microscopic image.

- US Patent 5,371,624 specifies a fluorescence microscope having only two excitation
- 25 bands in which the intensities of the two excitation bands can be intermittently affected. It includes an illumination beam path having a light source and an excitation filter that produces several excitation bands of varying light wavelengths from the light of the light source. Furthermore, it has a splitter mirror, an output filter (also designated as a barrier

THIS PAGE BLANK (USPTO)

filter or emission filter) for the fluorescent light and a filter element for affecting the intensities of the excitation bands.

5 The filter element can, by tilting continuously with respect to the optical axis, be switched between two limit positions having two fixed, predetermined values of the transmission factors of one or the other excitation band. In the one limit position, only the first excitation band is attenuated, in the other limit position only the second excitation band is attenuated and between the two limit positions, neither of the excitation bands is attenuated. A drop in the transmission factor of the particular excitation band is only
10 possible up to the fixed, predetermined value. However, variation between a maximum transmission and a zero value, i.e., up to full suppression of one of the two excitation bands, is not possible. Moreover, only two excitation bands can be affected.

15 It is object of the present invention to specify a method for individual adaptation of excitation intensities in a multiband fluorescence microscope and a multiband fluorescence microscope to execute the method, in which one or more of the excitation bands can be partially or completely filtered out. For this purpose the transmission factor for each excitation band is to be continuously adjustable using simple means.

20 This objective is met by the invention via the characterizing features of the independent claims. Advantageous embodiments arise from the features of the dependent claims.

The method of the invention starts from a known multiband fluorescence microscope in which several excitation bands of varying wavelengths are produced using an excitation
25 filter in an illumination beam path from the light of a light source. The excitation bands

THIS PAGE BLANK (USPTO)

illuminate a fluorescence object prepared using fluorescence dyes and are converted by it into frequency-shifted fluorescence bands.

- According to the invention, the fluorescence intensities of the individual fluorescence bands are first determined in the microscopic image and compared to previously set intensity setpoint values. The fluorescence intensities can be determined, for example, either visually or by using an intensity meter. This can consist for example of a video or CCD camera having an image analysis system connected in an outgoing circuit.
- 10 In this context a different intensity setpoint value can be set for each fluorescence band. However, in practice, the setpoint values are oriented toward concrete problems posed by the microscope user. If, for example, the microscopic image is to be documented either photographically or by video camera, and thus each fluorescence band in the photo or in the video image is to be reproduced with equal brightness, then the level of the setpoint
- 15 values depends on the spectral sensitivity of the film or the camera. Therefore, their spectral sensitivity must be taken into consideration in the determination of setpoint values for the various excitation bands.

- Therefore, the desired setpoint values must all be equal – and in particular equal to the lowest fluorescence intensity – provided that the film or the camera reproduces all spectral colors with equal intensity. However, if the spectral sensitivity of the video camera or of the film is not constant, then correspondingly varying setpoint values must be set for the different fluorescence bands in order to be able to reproduce the fluorescence bands with equal brightness.

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

On the other hand, if specific fluorescence bands do not appear on the photo or the video image, and thus are masked out, then the setpoint values for said bands must be equal to zero. In this context, it proves to be beneficial if the setpoint values are equal to the lowest of their intensities also for the fluorescence bands that are not masked out. Then
5 these fluorescence bands all appear equally bright.

For each excitation band that is assigned to a fluorescence intensity deviating from the setpoint values, a selective filter according to the present invention tuned to the pertinent excitation band is brought into the illumination beam path. Its spectral transmission curve
10 is configured so that exclusively the intensity of the pertinent excitation band is reduced, but the remaining spectral regions pass through unhindered.

In a multiband fluorescence microscope according to the invention for executing the method according to the invention, a filter draw assembly made of a multiplicity of
15 individually movable filter draws is perpendicularly inserted in the illumination beam path tightly next to the aperture diaphragm plane.

The structure of the filter draw is a function of the number of the different excitation bands of the multiband fluorescence microscope. For a number of n excitation bands,
20 each filter draw has n selective filters harmonized to the excitation bands and having surface regions with high and low transmission factors.

The different transmission factors are achieved by virtue of the fact that only certain area portions of the beam cross-section are occupied using separate filter-area elements. In this
25 context as even a surface coverage of the beam cross-section as possible is sought so that no unilateral shading, and thus also no unilateral illumination of the pupils, is made. As a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

result a crooked illumination, and thus a lateral migration of the picture elements, is prevented during focusing.

It must be possible to insert the filters in the illumination beam path independently of each other individually or in combination using the desired surface region or the desired transmission. In this context, it must be possible with n excitation bands to combine a maximum of $n-1$ filters with each other, i.e. simultaneously insert them in the illumination beam path. This is sufficient since all excitation bands must never be attenuated simultaneously, because as a rule an excitation band supplies the intensity setpoint value and remains unchanged. Likewise, all excitation bands must not be triggered simultaneously, since this is equivalent to turning off the lighting.

In order to achieve the required combinations from $n-1$ filters, $n-1$ individually movable filter draws that are situated tightly parallel next to the aperture diaphragm plane with little distance between them and are effectual in combination are arranged in an advantageous embodiment of a multiband fluorescence microscope according to the invention having n excitation bands on $n-1$ disk planes. With each filter draw, one filter for an excitation band can be suitably adjusted so that altogether a maximum of $n-1$ excitation bands (one less than the maximum number) can be selectively attenuated or triggered.

For two excitation bands, it is sufficient if the two required filters are arranged in a single disk plane ($n-1=1$), since either only the one or only the other filter must be inserted in the illumination beam path. Therefore, a filter draw assembly to affect two excitation bands is preferably of one piece, thus designed with only one filter draw. However, for



THIS PAGE BLANK (USPTO)

more than two excitation bands, a corresponding multi-piece filter draw assembly must be provided with $n-1$ individually movable filter draws.

5 Except for the selective filters for the various excitation bands, each filter draw has at least one blank aperture with the beam diameter of the illumination beam path. In this case a blank aperture is arranged next to each filter. Depending on the embodiment, the filters can also be grouped directly around a single blank aperture. The transmission factor of the filter diminishes in the shifting direction as the distance from the blank aperture increases. In this case each filter has a surface region with the lowest
10 transmission factor and a minimum diameter equal to the beam diameter x . If this surface region is inserted in the illumination beam path, the associated excitation band is maximally attenuated, i.e., to the zero value.

By correctly positioning each of the individual filters in the illumination beam path, the
15 transmission factor that is acting on the illumination beam path is precisely individually adjusted such that by attenuating the excitation band assigned to the filter, the resulting fluorescence intensity matches its intensity setpoint value. To execute this process step, separate positioning means, which bring about the full or partial covering of the illumination beam path using the appropriate surface region of the filter draw, are
20 assigned to each filter draw. Thus, the blank aperture or one or more of the filters or combinations of filter regions and the blank aperture can be inserted in the illumination beam path, according to preference. If this last process step was executed for all filters and thus all excitation bands, all fluorescence intensities match their setpoint values.

25 Even after optimal setting of the fluorescence intensities by applying the method according to the invention using a specified multiband fluorescence microscope,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

deviations of the fluorescence intensities from the setpoint values reoccur after some time. This is attributable to the fact that the various fluorescence dyes for the various excitation bands fade at differing rates, i.e., they exhibit a specific fading.

- 5 Therefore, in one advantageous embodiment of the method, the time changes of the fluorescence intensities are continuously determined. The transmission factors of the filter that are in effect within the illumination beam path are then repeatedly adjusted at specific time intervals so that the fluorescence intensities are always brought into accord with their setpoint values.

10

An especially advantageous embodiment of the method provides for an automatic fading compensation. For this purpose the time modifications of the fluorescence intensities are automatically continually determined. To do this the microscopic image, for example, can be automatically continually recorded using a video camera and the fluorescence

- 15 intensities contained therein can be determined using an image analysis system and compared to the predetermined setpoint values.

- Then the transmission factors of the filter are automatically continuously modified and adapted so that the fluorescence intensities are always kept at the intensity setpoint
- 20 values. To this end, motorized positioning means, for example, can be used. The drive of the motors and regulation of the fluorescence intensities in relation to the setpoint values can be achieved using an electronic unit and a computer to which the signals of the video camera or the image analysis system are fed.

- 25 The invention is explained in more detail below with respect to the schematic drawing.
Shown are:



THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Figure 1 a beam path of a multiband fluorescence microscope according to the invention;
- 5 Figure 2a-d various embodiments of a filter draw for a dual-band fluorescence microscope;
- Figure 2e the spectral transmission curve of the excitation bands and the assigned filter of a filter draw for a dual-band fluorescence microscope;
- 10 Figure 3a-c various embodiments of a filter draw for a two-piece filter draw assembly of a three-band fluorescence microscope;
- Figure 3d the spectral transmission curve of the excitation bands and the assigned filter of a filter draw for a three-band fluorescence microscope;
- 15 Figure 4a-b various embodiments of a filter draw for a three-part filter draw assembly of a four-band fluorescence microscope;
- 20 Figure 4c the spectral transmission curve of the excitation bands and the assigned filter of a filter draw for a four-band fluorescence microscope.

Figure 1 shows a beam path of a multiband fluorescence microscope for executing the method according to the invention. From a light source 1 an illumination beam path starts with an optical axis 2 in which a collector 3, a first lens member 4, an aperture diaphragm 5, a second lens member 6, a radiant field stop 7, a third lens member 8 and a excitation

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

filter 9 are arranged in succession to produce the excitation bands. The illumination beam path is deflected at a beam splitter 10 to an objective 11. It passes through the objective 11 and reaches a fluorescence object 12, which rests on a specimen stage 13.

5 The excitation bands produced by excitation filter 9 in the illumination beam path are converted into fluorescence bands 12 by fluorescence dyes that were injected in fluorescence object 12, and said bands are emitted by the fluorescence object in a frequency-shifted state. This fluorescence light passes through objective 11, beam splitter 10, an output filter 14, a tube lens 15 and reaches an intermediate image plane 16. The
10 intermediate image produced here can be considered by microscope user using an eyepiece 17. The intermediate image is displayed via a TV output on a video camera 18 having an image analysis system 19 connected in series. With this design the fluorescence intensities of the individual fluorescence bands in the microscopic image can be determined either visually using eyepiece 17 or using image analysis system 19 and then
15 compared to intensity setpoint values greater than or equal to zero.

To attenuate the excitation bands, a filter draw assembly 20 according to the invention, consisting in this example of two filter draws 21a and 21b, is inserted perpendicular to the optical axis 2 of the illumination beam path tightly next to, i.e., behind or in front of
20 aperture diaphragm plane 24. Arranged on each filter draw 21a, 21b are a blank aperture 22 and in addition several selective filters 23 tuned to the excitation bands. By arranging filter draws 21a, 21b as narrowly as possible, filters 23 can be situated as tightly as possible next to aperture diaphragm plane 24. This ensures that the inserted filter draws 21a, 21b are not visible in the image. A further advantage is that in this case the least
25 possible beam fanning occurs, so that the surface region of filter 23 can be kept as small as possible.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

According to the present invention, positioning means are assigned to each filter draw. In this context positioning means having the possibility of manual adjustability can be used in economic embodiments. Although motorized positioning means are more expensive, they permit an automation of the method according to the invention.

In the embodiment illustrated here, two motors 25a, 25b that can shift parallel to the aperture diaphragm plane and/or rotate filter draws 21a, 21b are arranged as positioning means for filter draws 21a, 21b. Using the motors 25a, 25b either the blank aperture 22 or a selective filter 23 or a combination of the two can be inserted in the illumination beam path by the particular assigned filter draw 21a or 21b. The motors 25a, 25b are driven by control electronics 26, which receive the input signal from the image analysis system 19.

The image analysis system 19 determines from the camera signal the deviation of the fluorescence intensities from their setpoint values. Then those excitation bands that cause the deviations from setpoint values are determined and one of the filter draws 21a, 21b is assigned to each of these excitation bands for attenuation. In the illustrated example, two excitation bands can thus be completely attenuated, i.e. to the zero value, or even partially attenuated. For each filter draw 21a, 21b a drive signal is produced for the associated motor 25a, 25b. Each filter draw 21a, 21b is continuously shifted via the associated motor 25a, 25b so that a filter 23 selectively acting on the assigned excitation band is inserted in the illumination beam path. Then the filter draw 21a or 21b is shifted further until a surface region of the inserted filter 23 has a transmission factor in the illumination beam path through which the assigned excitation band is attenuated to the intensity setpoint value. In this way, all excitation bands are set to their intensity setpoint values.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Different embodiments of filter draw assembly 20 or the filter draw 21 and the associated spectral transmission curves of the filters arranged on them are explained below.

5 A filter draw 21 for a multiband fluorescence microscope having two excitation bands A and D is depicted in Figure 2a. Applied to a rectangular glass plate 27 as different vapor deposition layers are a long-pass filter 29 for the intensity reduction of the short-wave excitation band A and a short-pass filter 28 for the intensity reduction of the long-wave excitation band D. They are located on the ends of the glass plate 27, and between them is the blank aperture 22 in the center of filter draw 21. Its cross-section is equal to the beam
10 diameter x in the aperture diaphragm 5 of the illumination beam path. Filter draw 21 can be continuously shifted by positioning means (not shown) longitudinally in both directions parallel to the aperture diaphragm plane 24. The movement is indicated by a double arrow.

15 Short-pass filter 28 and long-pass filter 29 are each applied in this version as a connected vapor-deposition layer. The transmission of the two filters 28, 29 is largest right next to blank aperture 22 and gets smaller as the distance from blank aperture 22 increases. To this end next to blank aperture 22 filter draw 21 is not completely covered with filters 28, 29, but rather the portion of the filter area increases as one moves from blank aperture 22
20 toward the end of filter draw 21.

Thus, the vapor-deposition layers on the ends of filter draw 21 form a rectangle with a minimum edge length equal to the beam diameter x . If this vapor-deposited rectangular area completely covers the illumination beam path, the smallest percentile is thus set and
25 the accompanying excitation band is completely attenuated, i.e., to the zero value. The

THIS PAGE BLANK (USPTO)

vapor-deposited rectangular area borders the base of vapor-deposited triangular area,
whose opposing corner faces blank aperture 22.

5 Via the vapor-deposited triangular areas, which always cover the beam diameter only
partially, the transmission factor of short-pass filter 28 and long-pass filter 29 in each
case diminishes as one moves from blank aperture 22 toward the ends of filter draw 21.
By inserting any fractional area of short-pass filter 28 or of long-pass filter 29, any
desired transmission factor of the filter 28, 29 in the illumination beam path can be
realized and thus one or the other excitation band can be weakened or faded out according
10 to preference.

A filter draw 21 for a multiband fluorescence microscope according to the invention
having two excitation bands A and D is likewise depicted in Figure 2b. Applied to a
rectangular glass plate 27 are a short-pass filter 28 for filtering the long-wave excitation
15 band A and a long-pass filter 29 for filtering the short-wave excitation band D as different
vapor-deposition layers.

Here, as in Figure 2a, the vapor-deposition layers in the direction of blank aperture 22
have a triangular contour. However, the triangles in this case are each not vapor-deposited
20 as connected areas, but rather as small area elements 30 of equal size. In this way a longer
adjustment range with higher transmissions is achieved for the two filters 28, 29. At the
ends of filter draw 21, the vapor-deposition layers form a rectangle having a minimum
edge length equal to the beam diameter x and thus a region of the least transmission with
which the assigned excitation band can be attenuated to zero.

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Another filter draw 21 for a multiband fluorescence microscope according to the invention having two excitation bands A and D is depicted in Figure 2c. Applied to a rectangular glass plate 27 are a short-pass filter 28 for filtering the long-wave excitation band A and a long-pass filter 29 for filtering the short-wave excitation band D as different vapor-deposition layers. Located between them is a blank aperture 22.

The filters 28, 29 are vapor-deposited in this version of filter draw 21 next to blank aperture 22 as separate area elements 30 formed in any way desired (here circular).

In this context, the size of area elements 30 and thus the portion of the area of filter draw 21 increases when moving from blank aperture 22 to the ends of filter draw 21. The transmission factor of filters 28, 29 is largest next to blank aperture 22 and diminishes when moving in the direction toward the ends of filter draw 21. On both ends of filter draw 21, each of the two filters 28, 29 have a completely vapor-deposited area with the smallest transmission factor, said area having at least the diameter x of the beam path.

Another filter draw 21 for a multiband fluorescence microscope according to the invention having two excitation bands A and D is depicted in Figure 2d. Applied to a rectangular glass plate 27 are a short-pass filter 28 for filtering the long-wave excitation band A and a long-pass filter 29 for filtering the short-wave excitation band D as different vapor-deposition layers. Located between them is a blank aperture 22.

In this embodiment the vapor-deposition layers are applied as strip-shaped area elements 30, the width of the strips increasing as one moves from the center to the ends of filter draw 21. In this way the transmission diminishes as one moves from the blank aperture 22 toward the ends of filter draw 21. Also here the two filters 28, 29 each have a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

completely vapor-deposited surface with the lowest possible transmission factor at both ends of filter draw 21, said surface having at least the diameter x of the beam path.

5 The spectral transmission curves of the short-wave excitation band A and the long-wave excitation band D, as well as the transmission curves T_A , T_D of the associated selective filter, thus the long-pass filter for the short-wave excitation band A and the short-pass filter for the long-wave excitation band D, are depicted in Figure 2e as a function of the light wavelength λ . Filters A and B are selected so that they only selectively filter out the associated excitation band for each but allow the remaining wavelength ranges to pass
10 through unhindered.

Figure 3a shows a rectangular filter draw 21 of a two-piece filter draw assembly 20 for a multiband fluorescence microscope having three excitation bands A, B, D. In this embodiment filter draw assembly 20 consists of two rectangular filter draws 21 identical
15 to said bands that are tightly inserted in the illumination beam path one behind the other next to the aperture diaphragm plane 24.

Provided in the center of filter draw 21 is the blank aperture 22 having diameter x of illumination beam path 2. Applied as vapor-deposition layers on the two ends of filter
20 draw 21 are two different combinations of two or three selective filters 28, 29, 31 for excitation bands A, B, D. The two filters 28, 31 or 29, 31 on one end are in each case arranged next to one another so that both filters border each other and blank aperture 22. In this context each filter 28, 29, 31 has an area of least transmission having at least the diameter x of illumination beam path 2. As a result filter draw 21 has at least a width of
25 $2x$ on its short end.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The transmission factor of filters 28, 29, 31 diminishes as one moves in the longitudinal direction of filter draw 21, thus in the direction of shift from blank aperture 22 toward the ends. This is realized in the example represented here in that the vapor-deposited surface of each filter 28, 29, 31 increases as one moves from blank aperture 22 toward the end of
5 filter draw 21.

Separate positioning means 25 for shifting filter draw 21 parallel to aperture diaphragm plane 24 in both the longitudinal and transverse directions are provided for each of the two identical shifters 21 of the filter draw assembly. As a result it is possible to insert
10 filters 28, 29, 31, individually or in combination, completely or with only a portion of their surface in the illumination beam path.

Figure 3b shows a circular filter draw 21 of a two-piece filter draw assembly 20 for a multiband fluorescence microscope according to the invention having three excitation
15 bands A, B, D. In this advantageous embodiment of the multiband fluorescence microscope according to the invention, filter draw assembly 20 consists of two circular filter draws 21 identical to said bands that are tightly inserted in the illumination beam path one behind the other next to the aperture diaphragm plane 24. Provided in the center of each filter draw 21 is blank aperture 22. Three selective filters 28, 29, 31 for excitation
20 bands A, B, D are arranged bordering said opening as vapor-deposited ring sectors that border each other.

Filters 28, 29, 31 each possess a transmission factor that decreases as radius increases and is largest next to blank aperture 22. This is accomplished, for example, by virtue of filters
25 28, 29, 31 not being fully vapor-deposited. Instead, vapor-deposited area elements 30 that get wider as they extend radially and that have non-vapor-deposited surface regions are

THIS PAGE BLANK (USPTO)

applied in between them next to blank aperture 22 so that the portion of vapor-deposited surface of each filter 28, 29, 31 increases as the radius increases.

Using separate positioning means (not shown here), each of the two identical filter draws 21 of filter draw assembly 20 can be shifted individually and parallel to aperture diaphragm plane 24. In this case it can either be laterally shifted in one direction and also rotated (as indicated in Figure 3b) or, alternatively, shifted within a plane in two directions. As a result any desired fractional area of filter draw 21, for example blank aperture 22 or one of the filters 28, 29, 31 having the desired transmission factor, can be inserted in the illumination beam path. By arranging two equal filter draws 21 in the illumination beam path, any two of the three filters 28, 29 31 can be inserted simultaneously in the illumination beam path so that two of the three excitation bands can be simultaneously weakened to the predetermined setpoint values or completely faded out.

Figure 3c shows an especially advantageous embodiment of a filter draw 21 for a two-piece filter draw assembly 20 of a multiband fluorescence microscope according to the invention having three excitation bands A, B, D. In this embodiment of the multiband fluorescence microscope, filter draw assembly 20 consists of two circular filter draws 21 identical to said bands that are inserted in the illumination beam path tightly in succession next to aperture diaphragm plane 24.

The filters 28, 29, 31 for the excitation bands A, B, D are advantageously arranged on the filter draw 21 such that it only has to be turned but not shifted (rotary movement is indicated). This simplifies the structure of the mechanical or even motorized positioning means, which are separately assigned to each of the two filter draws 21 (not shown).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In order to accomplish this, each filter draw 21 is designed with a circular shape, divided into six sectors and arranged pivoted around its center. The center of the circle lies outside the illumination beam path. Each sector can be turned by rotating filter draw 21 into the illumination beam path and cover it completely. The beam cross section with the diameter x is inscribed.

Each second sector is a blank aperture 22. Applied, for example glued on or vapor-deposited, in between each is one of the three filters 28, 29, 31 for the three excitation bands A, B, D. Each filter 28, 29, 31 exhibits an increase of the transmission factor inside its sector in one of the two directions of rotation, for example via different surface coverage with vapor-deposited area elements. As a result each filter 28, 29, 31 has next to the one neighboring blank aperture 22 a maximum transmission factor and next to the other neighboring blank aperture 22 a minimum transmission factor. By rotating the filter draw 21, one of the blank apertures 22 or one of the filters 28, 29, 31 with the desired transmission or a combination of the two can be inserted in the illumination beam path. The use of two identical filter draws 21 as a filter draw assembly makes it possible to attenuate up to two of the three excitations bands A, B, D simultaneously and independently of each other to the desired setpoint value.

20

Figure 3d shows the spectral transmission curves of the short-wave excitation band A, of the long-wave excitation band D and an intermediate excitation band B as a function of the light wavelength λ .

Furthermore, the transmission curves T_A , T_B , T_D of the accompanying selective filters are depicted, thus the long-pass filter for the short-wave excitation band A, of the short-pass

THIS PAGE BLANK (USPTO)

filter for the long-wave excitation band D and a selective filter for the excitation band B. The filters are selected so that they only selectively filter out the associated excitation band, but the remaining wavelength ranges pass through unhindered.

- 5 Figure 4a shows a circular filter draw 21 for a three-part filter draw assembly 20 of a multiband fluorescence microscope according to the invention having four excitation bands A, B, C, D. In this embodiment of the multiband fluorescence microscope according to the invention, filter draw assembly 20 consists of three circular filter draws identical to said bands that are tightly inserted in the illumination beam path one behind
10 the other next to the aperture diaphragm plane 24. Each filter draw 21 has a blank aperture 22 in the center. In addition four selective filters 28, 29, 31, 32 for the excitation bands A, B, C, D, are vapor deposited as ring sectors that border each other.

- The transmission factor of the filters 28, 29, 31, 32 diminishes as the radius increases and
15 is largest next to the blank aperture 22. This is achieved, for example, by vapor-depositing the filters 28, 29, 31, 32 not completely, but as ring-shaped area elements 30 with non-vapor-deposited areas with vapor-deposition between them, whereby the portion of the vapor-deposited area of each filter 28, 29, 31, 32 increases as the radius increases.

- 20 Separate positioning means (not shown) are assigned to each of the three filter draws 21 of filter draw assembly 20. Using these positioning means, each filter draw 21 can be moved individually and parallel to aperture diaphragm plane 24. In this case it can be shifted laterally in one direction and also rotated (as indicated in Figure 4a) or alternatively shifted in two directions within one plane.

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

As a result, any fractional area of filter draw 21, thus the blank aperture 22 or any fractional area filters 28, 29, 31, 32, can be inserted in the illumination beam path. By arranging three equal filter draws 21 in the illumination beam path, any three of the four filters 28, 29, 31, 32 can be simultaneously inserted in the illumination beam path. As a result up to three of the four excitation bands A, B, C, D can be weakened to the predetermined setpoint value or even faded out completely.

Figure 4b shows an especially advantageous embodiment of a filter draw 21 for a three-part filter draw assembly 20 for a multiband fluorescence microscope according to the invention having four excitation bands A, B, C, D. In this embodiment of the multiband fluorescence microscope according to the invention, filter draw assembly 20 consists of three circular filter draws 21 identical to said bands and are inserted in the illumination beam path tightly in succession next to aperture diaphragm plane 24.

The filters 28, 29, 31, 32 for the excitation bands A, B, C, D are arranged on the filter draw 21 such that it only has to be rotated, but does not have to be moved (rotating movement is indicated). That simplifies the design of the mechanical or even motorized positioning means that are separately assigned to each of the three filter draws 21 (not shown).

This is achieved by virtue of each filter draw 21 being designed with a circular shape, divided into eight sectors and mounted pivoted around its center. The center of the circle is outside the illumination beam path. By rotating the filter draw 21, each sector can be brought to totally or partially cover the illumination beam path. The beam cross section with the diameter x is inscribed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Every second sector is a blank aperture 22. In between them one of the four filters 28, 29, 31, 32 is applied, e.g., glued or vapor-deposited, for the three [sic] excitation bands A, B, C, D. Each filter 28, 29, 31, 32 exhibits an increase of the transmission factor inside its sector in one of the two directions of rotation, for example, via different area coverage.

- 5 As a result each filter 28, 29, 31, 32 has a maximum transmission factor next to the one neighboring blank aperture 22 and a minimum transmission factor next to the other neighboring blank aperture 22.

- 10 By rotating filter draw 21, one of blank apertures 22 or one of filters 28, 29, 31, 32 having the desired transmission of a combination of both can be inserted in the illumination beam path. By using three filter draws 21, up to three of the four excitation bands A, B, C, D can be attenuated to the desired setpoint value simultaneously and independently of one another.

- 15 In Figure 4c, the spectral transmission curves of the short-wave excitation band A, of the long-wave excitation wave excitation band D and of the two excitation bands B and C between them are represented as a function of the light wavelength λ . Furthermore, the transmission curves T_A , T_B , T_C , T_D are specified for the associated selective filter, thus the long-pass filter for the short-wave excitation band A, the short-pass filter for the long-
- 20 wave excitation band D, a selective filter for the excitation band B and a selective filter for the excitation band C. Filters A, B, C, D are selected so that they only selectively filter out the particular associated excitation band, but the remaining wavelength ranges pass through unhindered.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

For more than four excitation bands, the filter draw assembly 20 must be expanded accordingly. However, it is becoming increasingly difficult to place the individual filters close enough next to aperture diaphragm 5.

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Reference symbol list

	1	Light source
	2	Optical axis of the illumination beam path
5	3	Collector
	4	First lens member
	5	Aperture diaphragm
	6	Second lens member
	7	Radiant field stop
10	8	Third lens member
	9	Excitation filter
	10	Beam splitter
	11	Objective
	12	Fluorescence object
15	13	Specimen stage
	14	Output filter
	15	Tube lens
	16	Intermediate image plane
	17	Eyepiece on tube (17')
20	18	Video camera
	19	Image analysis system
	20	Filter draw assembly
	21	Filter draw (also 21a, 21b)
	22	Blank aperture
25	23	Selective filter(s)
	24	Aperture diaphragm plane



THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 25 Positioning means (25a, 25b motors)
- 26 Control electronics
- 27 Glass plate
- 28 Short-pass filter for the long-wave excitation band D (λ_4)
- 5 29 Long-pass filter for the short-wave excitation band A (λ_1)
- 30 Area element(s)
- 31 Subtractive filter for excitation B(λ_2)
- 32 Subtractive filter for excitation C(λ_3)
- x Beam diameter in the aperture diaphragm plane 24

10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims

1. A method for the individual adaptation of excitation intensities in a multiband
fluorescence microscope having several spectrally different excitation bands that
5 are simultaneously converted from an fluorescence object (12) into fluorescence
bands having fluorescence intensities,
wherein
 - a) the fluorescence intensities of the individual fluorescence bands in the
microscopic image are determined and compared to intensity setpoint
10 values larger than or equal to zero,
 - b) for each excitation band that is assigned to a fluorescence intensity
deviating from the intensity setpoint values, a selective filter (23; 28, 29,
31, 32) is brought into the illumination beam path.
 - c) and the transmission factors of the individual filters (23; 28, 29, 31, 32) in
15 effect in the illumination beam path are continuously adjusted so that by
attenuating the associated excitation bands, all fluorescence intensities are
adjusted to their intensity setpoint values.
2. The method as recited in Claim 1,
20 wherein
the setpoint values for the different fluorescence intensities are all equal to the
lowest fluorescence intensity.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3. The method as recited in Claim 1,
wherein
at least one of the setpoint values for the different fluorescence intensities is equal
to zero.
- 5 4. The method as recited in Claim 1,
wherein
for some fluorescence intensities the setpoint values are equal to zero and for the
rest are equal to the lowest fluorescence intensities.
- 10 5. The method as recited in Claim 1,
wherein
the different fluorescence intensities are visually determined.
- 15 6. The method as recited in Claim 1,
wherein
the different fluorescence intensities are determined using an intensity meter.
- 20 7. The method as recited in Claim 6,
wherein
the different fluorescent intensities are determined using a CCD or a video camera
(18) having an image analysis system (19).



THIS PAGE BLANK (USPTO)

8. The method as recited in Claim 1,

wherein

- a) modifications of the fluorescence intensities are continuously determined,
- b) and by repeated adaptation of the transmission factors of the filters (23;
28, 29, 31, 32) in effect in the illumination beam path, the fluorescence
intensities are always brought back to their setpoint values.

5

9. The method as recited in Claim 2,

wherein

- a) modifications of the fluorescence intensities are automatically
continuously determined,
- b) and by automatic continuous adaptation of the transmission factors of the
filters (23; 28, 29, 31, 32) in effect in the illumination beam path, the
fluorescence intensities are always kept at their setpoint values.

10

15



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10. A multiband fluorescence microscope for utilizing the method as recited in Claim 1, including an illumination beam path having a light source (1), a collector (3), a multiplicity of lens members (4, 6, 8), an aperture diaphragm (5), a radiant field diaphragm (7), an excitation filter (9) for simultaneous production of several excitation bands of different light wavelengths and a filter element to affect these excitation bands, also including a beam splitter (10) and an objective (11) that directs the illumination beam path onto a fluorescence object (12) on a specimen stage (13) and projects it through the beam splitter (10), an output filter (14) and a tube lens (15) into an intermediate image plane (16),
wherein
- a) a filter draw assembly (20) made of individually movable, tightly spaced filter draws (21; 21a, 21b) is inserted perpendicular in the illumination beam path tightly next to the aperture diaphragm (5),
 - b) a selective filter (23; 28, 29, 31, 32) is provided on each filter draw (21) for each excitation band that has surface regions with high and low transmission factors,
 - c) the surface region having the lowest transmission factor has a minimum diameter equal to the beam diameter (x) to completely cancel the excitation band,
 - d) a blank aperture (22) having the beam diameter (x) is arranged next to each filter (23; 28, 29, 31, 32),
 - e) the transmission factor of each filter (23; 28, 29, 31, 32) diminishes as one moves further away from the blank aperture (22),
 - f) and separate positioning means (25), with which any surface region of the filter draw (21) can be inserted in the illumination beam path, are assigned to each filter draw (21).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein

to affect a number n of excitation bands

- 5 a) the filter draw assembly (20) consists of $n-1$ filter draws (21) on separate,
tightly spaced $n-1$ layers/planes parallel to the aperture diaphragm plane
(24),
b) each filter draw (21) has at least one blank aperture (22) and n selective
filters (23; 28, 29, 31, 32) for the n excitation bands.

10

12. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein

to affect two excitation bands A, D a single filter draw (21) is provided,

- 15 a) that has on its one end a long-pass filter (29) to weaken the intensity of the
short-wave excitation band A,
b) that has on its other end a short-pass filter (28) to weaken the intensity of
the long-wave excitation band D,
c) and has the blank aperture (22) in between them,
d) and positioning means (25) for continually shifting the filter draw (21) are
20 mounted parallel to the aperture diaphragm plane (24).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13. The fluorescence microscope as recited in Claim 11,
wherein
 - a) the filter draw (21) has a transparent, rectangular glass plate (27) on whose
ends the short-pass filter (28) and the long-pass filter (29) applied as vapor
deposition layers are opposite one another,
5
 - b) and the short-pass filter (28) and the long-pass filter (29) each have an
increasing portion of the vapor-deposited glass surface, and as a result a
decreasing transmission as one moves from the blank aperture (22) toward
the ends of the filter draw (21).
10
14. The fluorescence microscope as recited in Claim 12,
wherein
the areas of the two vapor-deposition layers at the ends of the filter draw (21) each
have the form of a rectangle having a minimum edge length equal to the beam
15 diameter (x) against which the base of a vapor-deposited, isosceles triangle area
borders in the direction of the blank aperture (22).
15. The fluorescence microscope as recited in Claim 12,
wherein
20 the vapor-deposition layers are applied neither wholly or in part as connected are,
but rather as area elements (30) whose size or distances are selected differently as
one moves in the direction of shifting from the blank aperture (22) toward the
ends.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein
a two-piece filter draw assembly (20) is provided to affect three excitation bands
A, B, D,
 - 5 a) each filter draw (21) having a circular blank aperture (22) in the center,
 - b) three selective filters (28, 29, 31) for the excitation bands A, B, D having a
transmission factor that diminishes as the radius increases are arranged as
sectors around the center,
 - 10 c) and separate positioning means (25), with which the filter draws (21) can
be shifted independently of each other parallel to the aperture diaphragm
plane (24) and or rotated, are assigned to each filter draw (21).
17. The fluorescence microscope as recited in Claim 16,
wherein
15 to achieve a transmission factor that diminishes as the radius increases, the portion
of the vapor-deposited area of the filter (28, 29, 31) increases as the radius
increases.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein
a two-piece filter draw assembly (20) made of two circular filter draws (21) is
provided to affect three excitation bands A, B, D,
- 5 a) each filter draw (21) being divided into six sectors covering the
illumination beam path and being arranged around its center situated
outside the beam path,
- b) every second sector being a blank aperture (22) and with one of the three
selective filters (28, 29, 31) for the excitation bands A, B, D being situated
10 between each pair.
- c) each filter (28, 29, 31) exhibiting an increase of the transmission factor in
one of the two directions of rotation.
- d) and separate positioning means (25) being provided for rotating each filter
draw (21) around its center and parallel to the aperture diaphragm plane
15 (24).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein

a two-piece filter draw assembly (20) made of two rectangular filter draws (21) is
provided to affect three excitation bands A, B, D,

- 5 a) each filter draw (21) having a blank aperture (22) in the center and having
at both of its ends two different combinations of two out of three of the
selective filters (28, 29, 31) for the excitation bands,
- b) the transmission factor of the filters (28, 29, 31) diminishing in the
longitudinal direction of the filter draw (21) moving from the blank
10 aperture (22) toward the ends,
- c) and separate positioning means (25) being arranged for shifting the filter
draw (21) in the longitudinal direction and parallel to the aperture
diaphragm plane (24).

15 20. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein

a three-piece filter draw assembly (20) made of three circular filter draws (21) is
provided to affect four excitation bands A, B, C, D,

- 20 a) each filter draw (21) having a blank aperture (22) in the center and four
selective filters (28, 29, 31, 32) situated around said center for the
excitation bands as vapor-deposited ring sectors that border each other and
have a transmission factor that decreases as the radius increases,
- b) and separate positioning means (25) being provided parallel to the aperture
diaphragm plane for shifting and/or rotating each filter draw (21).

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

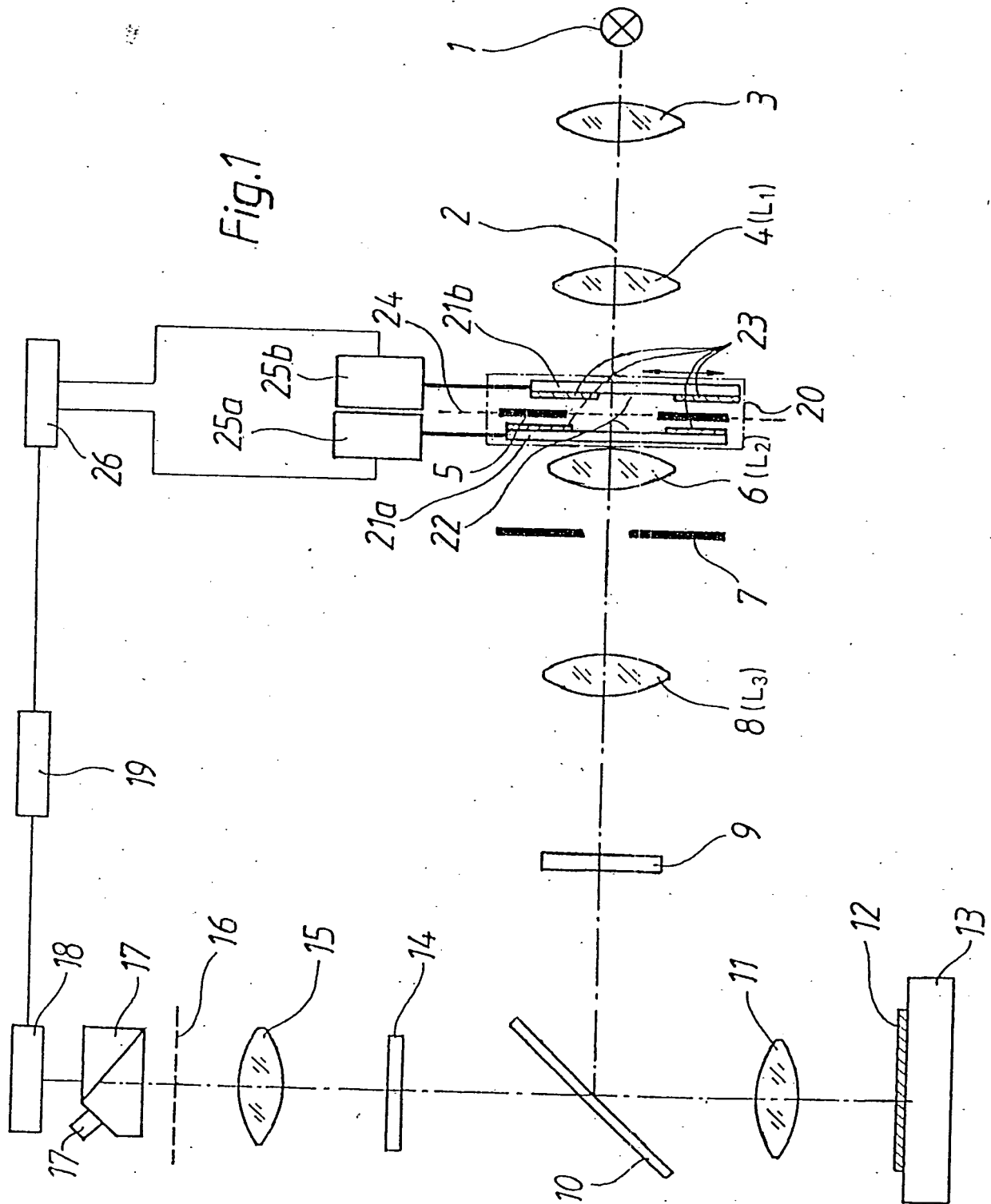
21. The fluorescence microscope as recited in Claim 10,
wherein
a three-piece filter draw assembly (20) made of three circular filter draws (21) is
provided to affect four excitation bands A, B, C, D,
- 5 a) each filter draw (21) being divided into eight sectors covering the
illumination beam path and being located pivoted around its center, which
lies outside the beam path,
- b) every second sector being a blank aperture (22) and in between them being
situated one of the four selective filters (28, 29, 31, 32) for the excitation
10 bands,
- c) each filter (28, 29, 31, 32) showing an increase in the transmission factor
in one of the two directions of rotation,
- d) and separate positioning means (25) being provided for rotating each filter
draw (21) around its center and parallel to the aperture diaphragm plane
15 (24).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

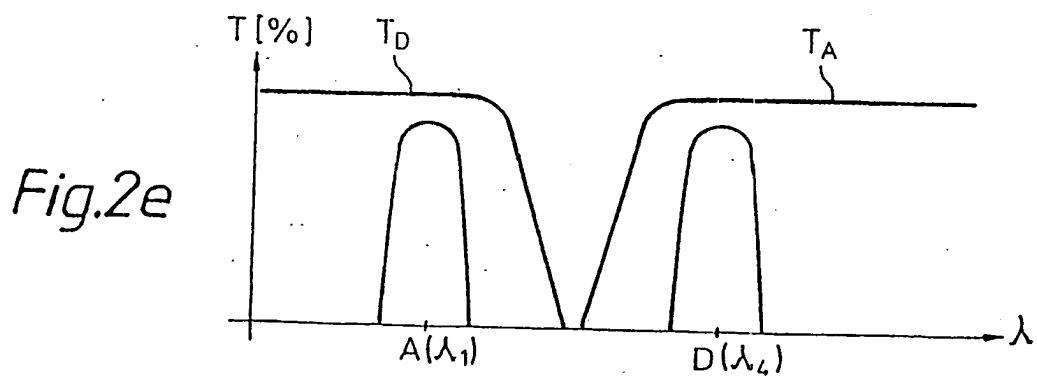
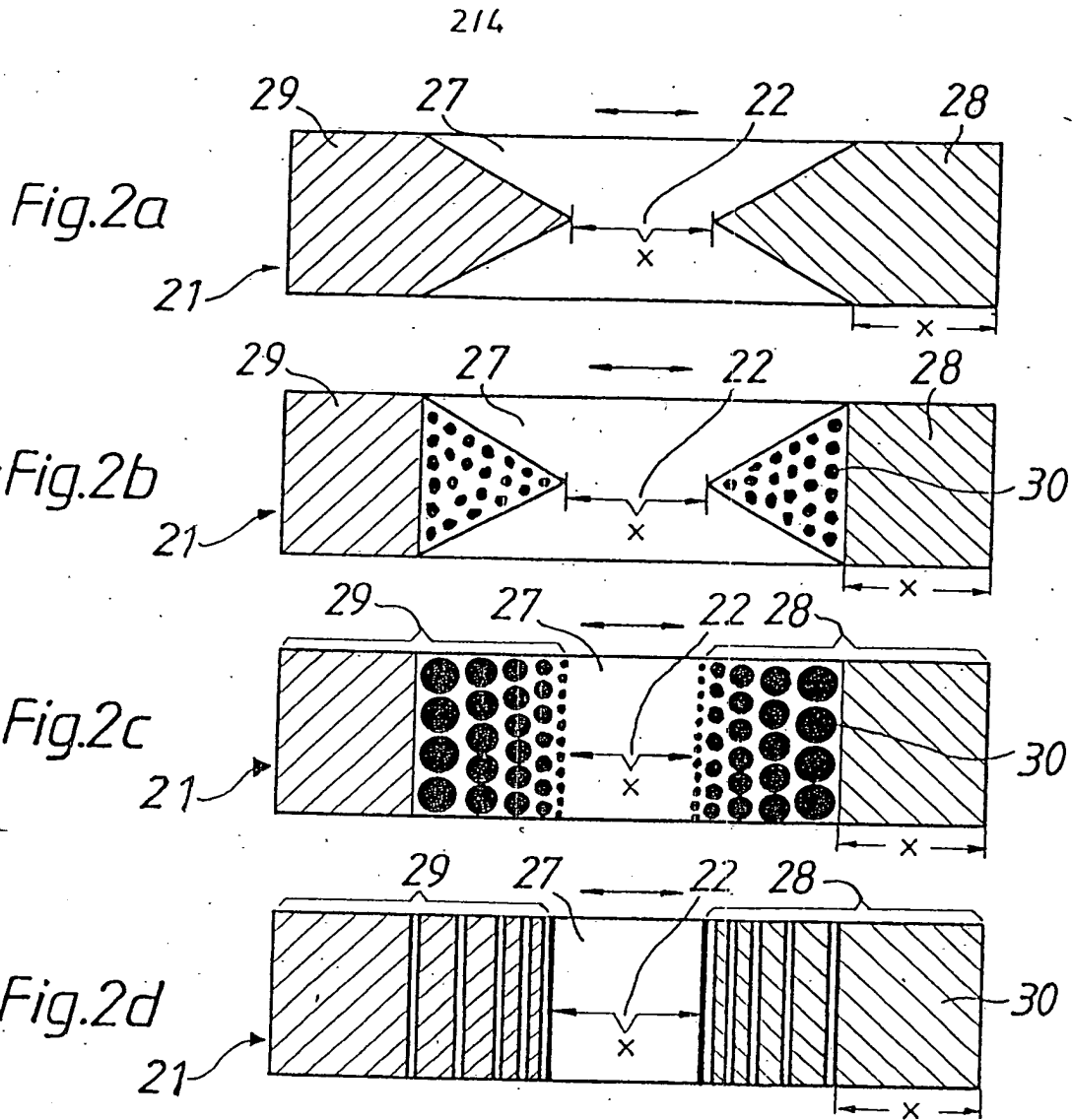
ABSTRACT

The invention relates to a method for the individual adaptation of excitation intensities in a multiband fluorescence microscope with several excitation bands that are different in their spectrums and with associated fluorescence bands. The intensities of the individual
5 fluorescence bands in the microscope image are determined and compared with standard intensity values greater than or equal to zero. For every excitation band that is assigned to a fluorescence intensity deviating from the standard intensity values a selective filter (23; 28, 29, 31, 32) is introduced into the illumination optical path. The transmission degree of the illumination optical path is variably adjusted in such a manner that by
10 attenuating the excitation band the associated fluorescence intensity is adjusted to its standard intensity value. A multiband fluorescence microscope for carrying out the method has a set of filter slides (20) close to the aperture diaphragm (5) which set consists of individually displaceable, closely spaced apart filter slides (21; 21a, 21b) with selective filters (23; 28, 29, 31, 32) with a continuously adjustable transmission degree
15 for every excitation band and with at least one free opening (22). The invention also relates to various advantageous embodiments of the set of filter slides (20).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

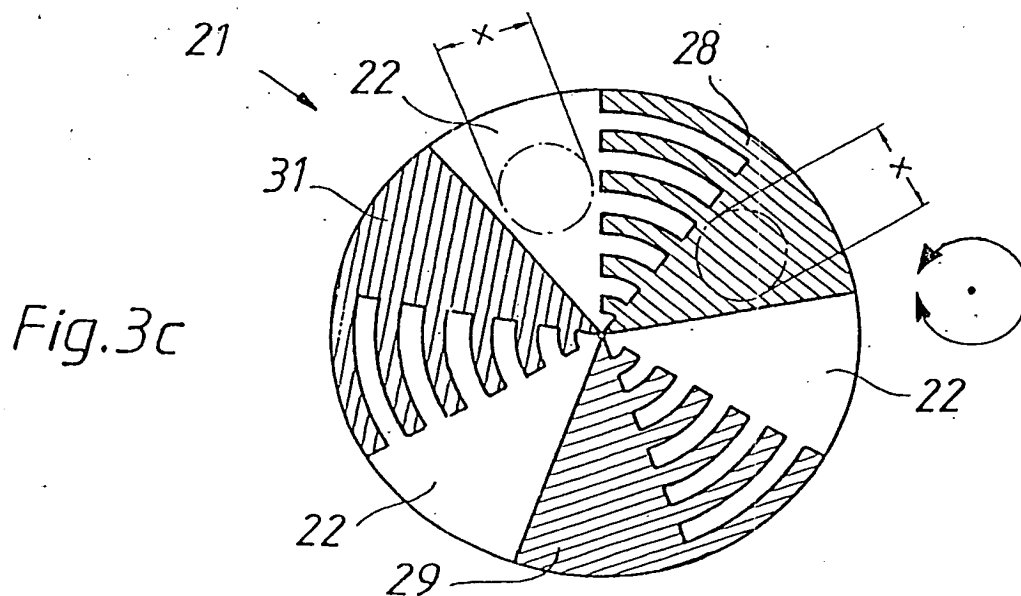
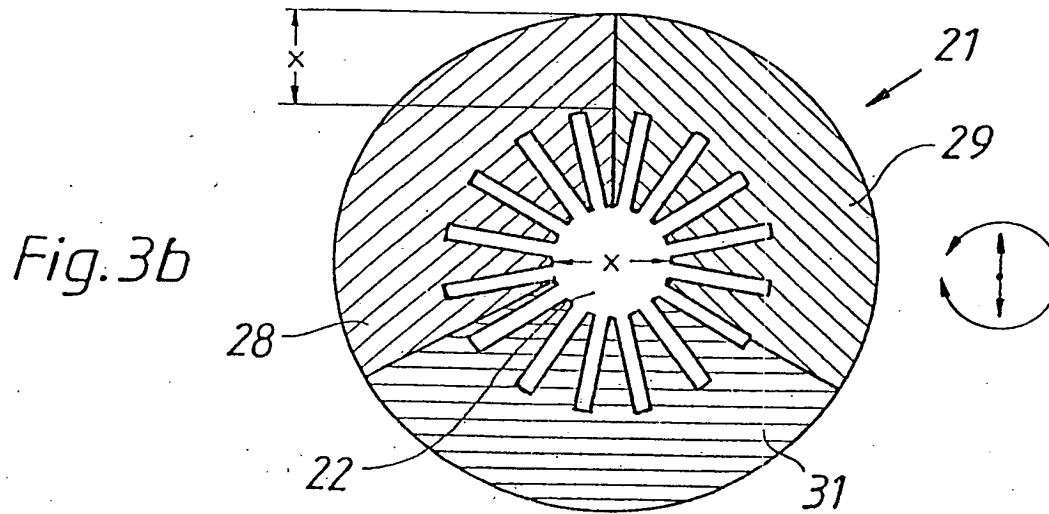
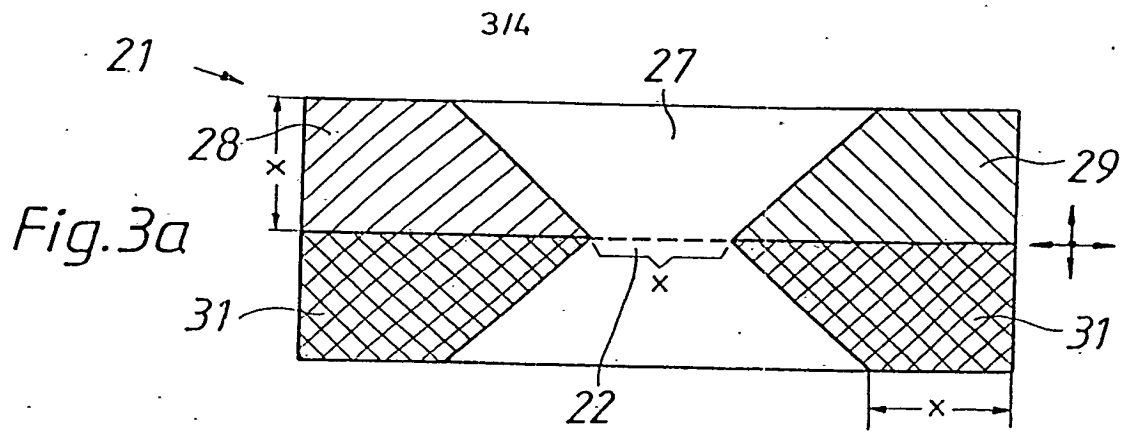


THIS PAGE BLANK (USPTO)

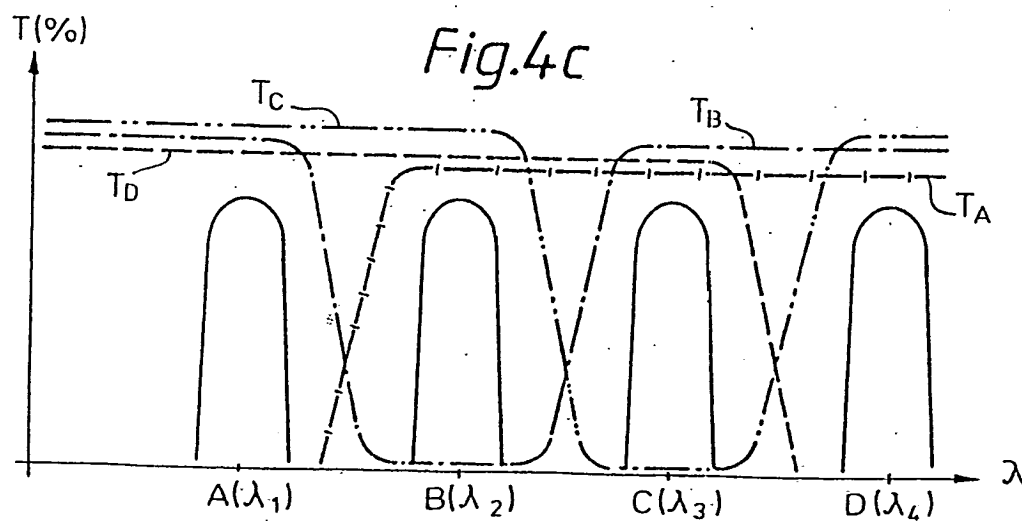
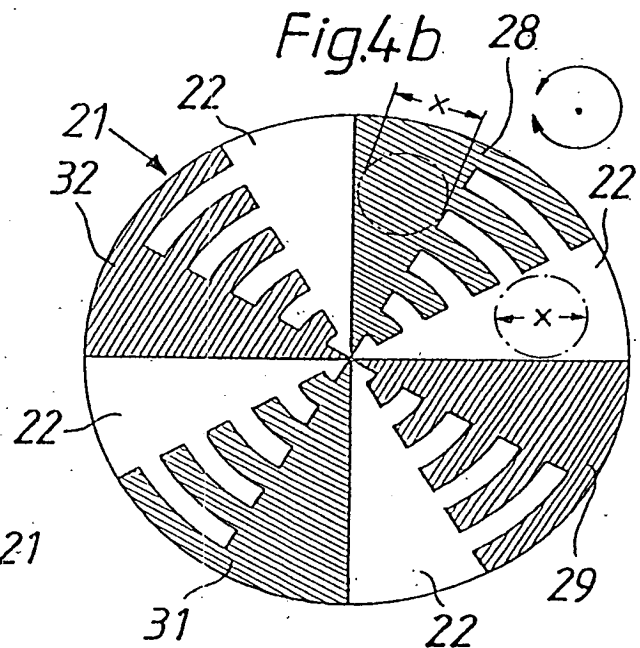
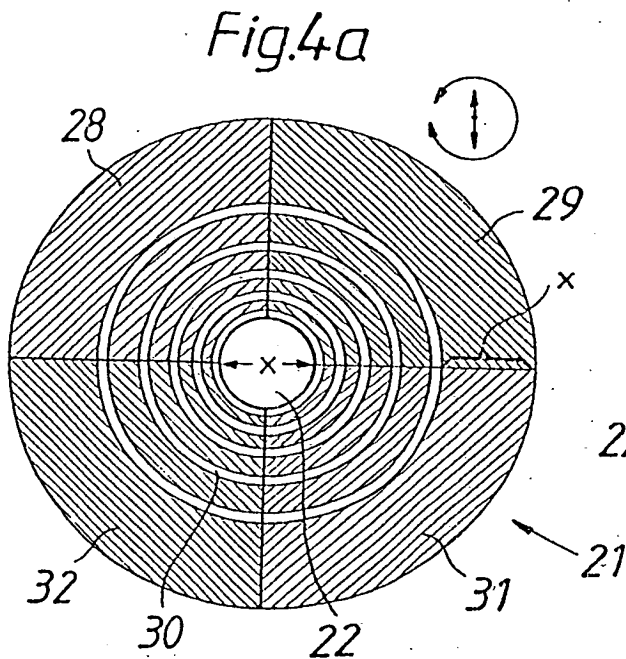
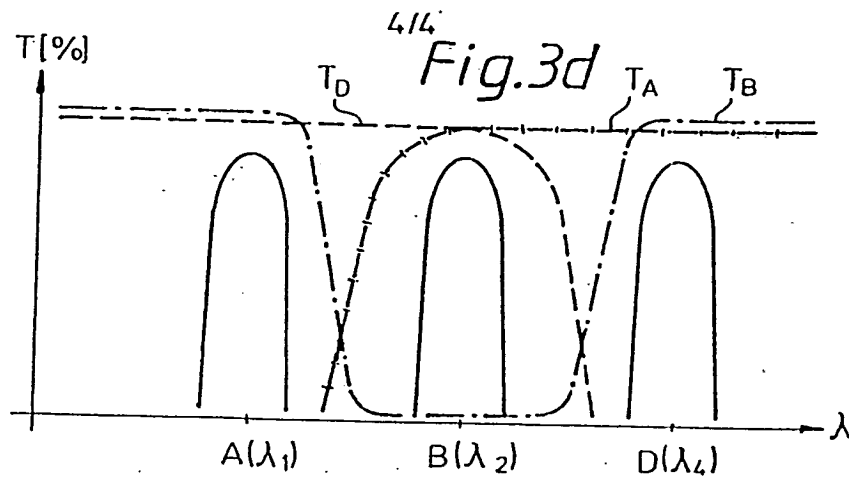


JC03 Rec'd PCT/PTC 14 JUN 2001

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/868429
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference E 0399 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/03768	International filing date (day/month/year) 27 November 1999 (27.11.99)	Priority date (day/month/year) 17 December 1998 (17.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G02B 21/16		
Applicant LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

TECHNICAL CLERK
1999 12 17
12:13:23
12/16/99

Date of submission of the demand 28 June 2000 (28.06.00)	Date of completion of this report 23 February 2001 (23.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03768

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-19, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 1-21, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1/4-4/4, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/03768

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-21	YES
	Claims	1	NO
Inventive step (IS)	Claims	10-21	YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Prior art

- D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995,
no. 03, 28 April 1995 -& JP-A-06 331 894
(OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 2 December 1994
- D2: US-A-5 710 663 (KAWASAKI KENJI)
20 January 1998
- D3: WO-A-98/45744 (NORTHERN EDGE ASSOCIATES
INC; RICHARDSON TIMOTHY M (CA))
15 October 1998
- D4: US-A-5 371 624 (NAGANO TAKASHI ET AL)
6 December 1994 mentioned in the
application

2. **Claim 1** does not meet the requirements of PCT
Article 33(2) (novelty). The reasons for this are
the following:

- 2.1 D1 (see particularly the text of the abstract and
Figures 1, 2, 5 and 6 of the patent document)
discloses a

Device for the individual adjustment of excitation
intensities ("...device 16 which *individually adjusts*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

light wavelength": see lines 4-5 of the abstract) in a multiband fluorescent microscope with several spectrally different excitation bands (see above), which are turned into fluorescence bands with fluorescence intensities (specimen: see line 3) ("two or more kinds of fluorescent images emitted from a specimen": see lines 2-3) by a fluorescent object 11, so that

* the fluorescence intensities of the individual fluorescence bands in the microscope image are determined

(because the microscope in D1 is a microscope for monitoring individual fluorescence bands)

* and are compared with the intensity setpoints
(The device presented in D1 is designed to give the best possible image/photo of the fluorescence of the sample (see abstract: lines 1-3). This necessarily entails an evaluation of the fluorescence intensities registered with this device and, following from this evaluation - to get said best possible picture - the option of either a reinforcement, a weakening or the retention of the fluorescence intensities; i.e. the given fluorescence intensity is brought into relation with a given setpoint.)

* a selective filter 34a (or 34b, 34c, etc.) is brought into the illuminating beam for each excitation band λ_{EA} (or λ_{EB} , λ_{EC} , etc.) assigned to one of the fluorescence intensities differing from the intensity setpoints.

("light quantity adjusting device 16 ...
individually adjusts the quantity of light of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

each narrow-band exciting light wavelength":
abstract, lines 5-7; with 34a (or 34b, 34c,
etc.) being a component of 16: see Fig. 1-2)

* and the transmission degrees of the filters
effective in the illuminating beam are continuously
adjusted so that

(rotation of interference filter 34a (or 34b,
34c, etc.) enables continuous adjustment of the
transmission: compare shaded areas in Figure 6
at 0° with those at 45°)

* attenuation of the associated excitation bands
adjusts all fluorescence intensities to their
intensity setpoints.

(To achieve the best possible image result (see
abstract, line 1) the user of the device from
D1 will obviously strive to adjust the
fluorescence intensities to desired values,
that is their intensity setpoints. It is
logical that the use of the interference
filters cannot reinforce but only weaken the
corresponding excitation bands as regards their
corresponding original output energy.)

2.2. The features of the device from D1 (PCT Article
33(2)) therefore anticipate all steps of the method
according to Claim 1.

If any differences between the disclosure of D1 and
the method according to Claim 1 should be assumed
they do not at any rate involve an inventive step
under PCT Article 33(3).

3. Dependent Claims 2-9 do not appear to contain any
additional features which, combined with the
features of any claim to which they refer, meet the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT requirements for a method involving an inventive step according to PCT Article 33(3). The reasons are as follows:

- 3.1 **Claim 2:** The choice of similar setpoints for the fluorescence intensities seems to be an obvious option because the phenomenon that the different fluorescence bands in the microscope image have different intensities is a well-known problem in multiband fluorescence microscopy (see description: page 1, lines 8-10). In such a choice the setpoint inevitably cannot be higher than the lowest fluorescence intensity.
- 3.2 **Claim 3:** Blacking out a certain fluorescence band does not reveal an inventive concept.
- 3.3 **Claim 4:** Compare remarks regarding Claims 2 and 3.
- 3.4 **Claims 5, 6 and 7:** The definition of fluorescence intensity by visual means (provided that the fluorescence is in the visible range) and with the other means mentioned here is part of the prior art - compare D1 (Fig. 1: 14 and 15), D2 (Fig. 1: 24 and 23) and D3 (see e.g. page 23, lines 15-31).
- 3.5 **Claims 8 and 9:** The phenomenon of changes of fluorescence intensity taking place over time, such as fading, is known to the person skilled in the art, cf. e.g. the application (page 1, lines 16-18) or D2 (column 1, lines 37-38). The person skilled in the art would therefore be aware of the fact that it is necessary to repeatedly adjust the excitation intensities if the fluorescence intensities are to be held at the individual setpoints. In a method

THIS PAGE BLANK (USPTO)

which in a first step uses the definition of these very setpoints for the adjustments of the excitation intensities, the person skilled in the art would therefore obviously continuously determine the changes of the fluorescence intensities to adjust these fluorescence intensities to their setpoints in case of a divergence from the latter by means of the operational features of the device, i.e. by an adjustment of the filters which are active in the illuminating beam.

Automation methods are known in the field of fluorescence microscopy, particularly for the change of the excitation intensity, cf. D4: column 13, lines 37-63.

4. **Claim 10**

4.1 Claim 10 defines a multiband fluorescence microscope with an excitation filter and an output filter, which is provided with a certain filter element to influence the different excitation bands. This element consists essentially of a set of filter slides, with each filter slide being provided with one selective filter for each excitation band and the filters having surface areas with high and low transmission rates.

4.2. Novelty and inventive step

(i) None of documents D1 (see Figure 2), D2 (see e.g. Figure 7 and 8A-D, column 9, line 48 - column 10, line 47), or D4 (less relevant) describes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

a single filter slide which (when there is more than one excitation band - see page 22, lines 4-6 of the application) provides for a selective filter for each excitation band. D3 does not define the feature that a free aperture with the beam diameter has to be arranged next to every filter and further does not describe any means of adjustment with which any desired area segment of the filter slide can be introduced in the illuminating beam. The multiband fluorescence microscope defined in Claim 10 therefore is novel (PCT Article 33(2)).

(ii) The problem to be solved by Claim 10 is creating the possibility of continuously adjusting the transmission rate for each excitation band and thus of selectively changing the corresponding fluorescence intensity. This problem is known from D1 and is solved there in a different way than in the application.

On the other hand, D3 (see particularly page 24, lines 26-33, page 26, lines 3-29, and Figures 2, 10 and 13-14), which hardly touches on the problem mentioned above, describes rotatable filter slides with three or four filters (see Figures 13 and 14) as excitation filters (see page 26, lines 8-12 in combination with page 5, lines 14-17). Such a filter slide according to Figure 13 or 14 obviously is provided with a selective filter for every excitation band. The same document indicates the possibility that the light intensity in the beam path between the light source and the object is to be compensated by means of such a "rotating filter wheel 380" (see page 11, lines 16-18: "to compensate the intensity of"); concretely, however, the

76

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aforementioned rotating filter wheels are not operated in an "intermediate position", i.e. they rotate from one filter directly to the next filter (see page 24, line 27 and page 25, lines 6-12), and so they obviously are also not provided with a free opening with the beam diameter next to each filter (see page 32, lines 20-29, Fig. 13-14); moreover, it is not possible to introduce any desired area range of the filter slide in the illuminating beam. In fact only a long-pass filter is suggested for influencing an individual wavelength range, i.e. not a filter having a selective effect on each excitation band (see page 26, lines 20-26).

(NB: Where the use of other rotatable filters is mentioned in D3 - see e.g. page 24, lines 28-30, page 25, lines 31-37, page 27, line 34 - page 28, line 3, page 29, lines 13-18 - these are situated "beyond" the sample.)

To selectively influence the fluorescence intensity of the excitation bands the teaching of this document and the other documents from prior art therefore would not necessarily lead the person skilled in the art to a microscope according to Claim 10.

The subject matter of Claim 10 therefore is not suggested (PCT Article 33(3)).

5. **Claims 11-21** apply to preferred embodiments of the fluorescence microscope defined in Claim 10 and therefore also meet the requirements of PCT Article 33(2)-(4) - provided they are clarified according to Box VIII (see below).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03768

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. **Claim 12:** The word "der" (after "zur") in line 19 of page 23 of the German application is superfluous (see also page 10, line 14 of the description).
2. Contrary to **PCT Rule 5.1(a)(ii)**, the description does not cite D1 and D3 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 13-15, 18-19 and 21 do not meet the requirements of PCT Article 6 as regards clarity. The reasons for this are the following:

1. In **Claim 13** the reference is unclear. Claim 13 probably is meant to refer to Claim 12, because neither Claim 11 nor Claim 10 mention short-pass filters or long-pass filters and the number of two filters is sufficient for influencing only two excitation bands - as described in Claim 12.
2. **Claim 14 and 15** should depend on Claim 13 because no evaporated coating is mentioned in Claim 12.
Claim 14 is understood in a way in which the word "dem" (see line 5, page 24) is to be replaced by "an die" (cf. page 10, line 28 of the application).
3. **Claim 18:** part c) of this claim is interpreted in the following way (see description: page 15, lines 16-18):
"each filter (28, 29, 31) has an increase in transmission rate in one of the two rotation directions *within its sector*".
4. **Claim 19**
 - 4.1 Regarding part a): The wording does not indicate clearly that each filter slide is provided with two individual, separated filters on each end. With

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

reference to the description Claim 19 is expanded to be understood in the following way:

a) "each filter slide (21) being provided with a free opening (22) in the middle and two different combinations of two of the three selective filters (28, 29, 31) for the excitation bands at each of the two ends,

with the filters at one end being arranged side by side so that the two filters are adjacent to each other and to the free opening (22)".

4.2 Regarding part c): Because proper functioning requires the two filter slides to be moved in the transverse as well as in the longitudinal direction (always parallel to the layer of the aperture diaphragm 24) (see description page 13, lines 22-25, as well as Figure 3a), this part is to be understood accordingly:

c) "and provided with separate adjustment means (25) for the displacement of the filter slide (21) *parallel to the layer of the aperture diaphragm (24) in the longitudinal as well as in the transverse direction*" (cf. page 13, lines 23-25).

5. **Claim 21:** Part c): see remarks on Claim 18 (cf. page 17, lines 26-29 of the description).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interv. no/ Application No
PCT/DE 99/03768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G02B21/16 G02B21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 03, 28 Apr11 1995 (1995-04-28) -& JP 06 331894 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 2 December 1994 (1994-12-02) abstract	1
A		10
X	US 5 710 663 A (KAWASAKI KENJI) 20 January 1998 (1998-01-20) column 7, line 27 - line 44 column 9, line 48 -column 10, line 47 figures 4,7,8	1
A		10
A	WO 98 45744 A (NORTHERN EDGE ASSOCIATES INC ;RICHARDSON TIMOTHY M (CA)) 15 October 1998 (1998-10-15) page 26, line 6 - line 19	10
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 Apr11 2000

Date of mailing of the international search report

13/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Luck, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No
PCT/DE 99/03768

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 371 624 A (NAGANO TAKASHI ET AL) 6 December 1994 (1994-12-06) cited in the application	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern. Patent Application No

PCT/DE 99/03768

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 06331894 A	02-12-1994	NONE	
US 5710663 A	20-01-1998	JP 8320437 A	03-12-1996
WO 9845744 A	15-10-1998	AU 7019798 A	30-10-1998
		EP 0978008 A	09-02-2000
US 5371624 A	06-12-1994	JP 5150164 A	18-06-1993
		JP 5188299 A	30-07-1993

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03768

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>US 5 371 624 A (NAGANO TAKASHI ET AL) 6. Dezember 1994 (1994-12-06) in der Anmeldung erwähnt</p>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03768

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G02B21/16 G02B21/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 03, 28. April 1995 (1995-04-28) -& JP 06 331894 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 2. Dezember 1994 (1994-12-02)	1
A	Zusammenfassung	10
X	US 5 710 663 A (KAWASAKI KENJI) 20. Januar 1998 (1998-01-20)	1
A	Spalte 7, Zeile 27 - Zeile 44 Spalte 9, Zeile 48 - Spalte 10, Zeile 47 Abbildungen 4,7,8	10
A	WO 98 45744 A (NORTHERN EDGE ASSOCIATES INC ; RICHARDSON TIMOTHY M (CA)) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Seite 26, Zeile 6 - Zeile 19	10
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/04/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luck, W

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03768

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 06331894 A	02-12-1994	KEINE	
US 5710663 A	20-01-1998	JP 8320437 A	03-12-1996
WO 9845744 A	15-10-1998	AU 7019798 A	30-10-1998
		EP 0978008 A	09-02-2000
US 5371624 A	06-12-1994	JP 5150164 A	18-06-1993
		JP 5188299 A	30-07-1993

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 27 FEB 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E 0399 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03768	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/11/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G02B21/16		
Anmelder LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 28/06/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 23.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Jacobs, A Tel. Nr. +49 89 2399 2830 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-21 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

72

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03768

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	2-21
	Nein: Ansprüche	1
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	10-21
	Nein: Ansprüche	1-9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Die Ansprüche 13, 14, 15, 18, 19 und 21 erfüllen nicht die Erfordernisse von Artikel 6 PCT in Bezug auf Klarheit. Die Gründe hierfür sind folgende:

1. In **Anspruch 13** ist der Rückbezug unklar. Anspruch 13 soll sich vermutlich auf Anspruch 12 beziehen, da weder in Anspruch 11 noch in Anspruch 10 Kurz- oder Langpassfilter erwähnt werden, und die Zahl von zwei Filtern nur zur Beeinflussung *zweier* Anregungsbänder – wie in Anspruch 12 beschrieben – ausreichend ist.
2. Die **Ansprüche 14 und 15** sollten von Anspruch 13 abhängig sein, da in Anspruch 12 keine Aufdampfschichten erwähnt werden. **Anspruch 14** wird so verstanden, dass das Wort "dem" (siehe Zeile 5 auf Seite 24) durch den Ausdruck "an die" ersetzt wird (vergleiche S. 10, Z. 28 der Anmeldung).
3. **Anspruch 18:** Teil c) dieses Anspruchs wird auf folgende Weise interpretiert (vgl. Beschreibung: Seite 15, Zeilen 16-18):
"jedes Filter (28, 29, 31) *innerhalb seines Kreissektors* in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads aufweist".
4. **Anspruch 19**
 - 4.1. Zu Teil a): Aus dem Wortlaut geht nicht klar hervor, dass jeder Filterschieber an seinen beiden Enden jeweils zwei einzelne, getrennte Filter aufweist. Unter Zuhilfenahme der Beschreibung (S. 13, Z. 11-13) wird Anspruch 19 ergänzt, so dass er wie folgt verstanden wird:
a) "jeder Filterschieber (21) in der Mitte eine freie Öffnung (22) und an seinen beiden Enden zwei unterschiedliche Kombinationen aus jeweils zwei der drei selektiven Filter (28, 29, 31) für die Anregungsbänder aufweist,
wobei die beiden Filter an einem Ende jeweils so nebeneinander angeordnet sind, daß beide Filter aneinander und an die freie Öffnung (22) angrenzen".
 - 4.2. Zu Teil c): Da die beiden Filterschieber für die Funktion sowohl in Längsrichtung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

als auch in Querrichtung (stets parallel zur Aperturblendenebene 24) bewegt werden müssen (s. Beschreibung S. 13, Z. 22-25, sowie Fig. 3a), ist dieser Teil entsprechend zu verstehen:

c) "und separate Verstellmittel (25) zum Verschieben des Filterschiebers (21) *parallel zur Aperturblendenebene (24) sowohl in Längsrichtung als auch in Querrichtung* angeordnet sind." (vgl. S. 13, Z. 23-25).

5. **Anspruch 21**, Teil c): Siehe Bemerkung zu Anspruch 18 (vgl. S. 17, Z. 26-29 der Beschreibung).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. **Stand der Technik:**

- D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 03, 28. April 1995
—& JP 06 331894 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 2. Dezember 1994
D2: US 5 710 663 A (KAWASAKI KENJI) 20. Januar 1998
D3: WO 98 45744 A (NORTHERN EDGE ASSOCIATES INC; RICHARDSON
TIMOTHY M (CA)) 15. Oktober 1998
D4: US 5 371 624 A (NAGANO TAKASHI ET AL) 6. Dezember 1994 in der
Anmeldung erwähnt

2. **Anspruch 1** erfüllt nicht die Erfordernisse von Artikel 33(2) PCT (Neuheit). Die Gründe hierfür sind die folgenden:

- 2.1 Die Druckschrift D1 (siehe insbesondere den Text des Abstracts, sowie die Figuren 1, 2, 5 und 6 der Patentschrift) offenbart eine

Vorrichtung zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten ("*...device 16 which individually adjusts the quantity of light of each narrow-band exciting light*")

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wavelength": s. Z. 4-5 des Abstracts) bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop (fluorescent microscope) mit mehreren spektral verschiedenen Anregungsbändern (s.o.), die von einem Fluoreszenz-Objekt 11 (specimen: s. Z. 3) in Fluoreszenzbänder mit Fluoreszenz-Intensitäten umgesetzt werden ("two or more kinds of fluorescent images emitted from a specimen": s. Zeilen 2-3), so dass

* die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild bestimmt

(da es sich in D1 um ein Mikroskop zur Beobachtung einzelner Fluoreszenzbänder handelt)

* und mit Intensitäts-Sollwerten verglichen werden

(Mit der in D1 vorgestellten Vorrichtung soll ein möglichst gutes Bild/Foto der Fluoreszenzen der Probe erhalten werden (s. Abstract: Z. 1-3). Daraus folgt zwangsläufig, dass eine Bewertung der mit dieser Vorrichtung aufgenommenen Fluoreszenzintensitäten vorgenommen wird, und in Folge dieser Bewertung – um besagtes bestmögliches Bild zu bekommen – entweder eine Verstärkung, eine Abschwächung oder aber die Beibehaltung der jeweiligen Fluoreszenzintensität erwogen werden wird; d. h. die jeweilige Fluoreszenzintensität wird mit einem jeweiligen Sollwert in Beziehung gesetzt.),

* für jedes Anregungsband λ_{EA} (oder λ_{EB} , λ_{EC} , etc.), das einer von den Intensitäts-Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, ein selektives Filter 34a (oder 34b, 34c etc.) in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht wird ("light quantity adjusting device 16 ... individually adjusts the quantity of light of each narrow-band exciting light wavelength": Abstract, Z. 5-7; dabei ist 34a (oder 34b, 34c etc.) eine Komponente von 16: s. Fig. 1-2),

* und die im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der einzelnen Filter stufenlos so eingestellt werden

(Drehen des Interferenzfilters 34a (oder 34b, 34c etc.) ermöglicht stufenlose Verstellung der Transmission: vergleiche schraffierte Flächen in Fig. 6 bei 0° mit denen bei 45°),

* dass durch Dämpfung der zugehörigen Anregungsbänder alle Fluoreszenz-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Intensitäten auf ihre Intensitäts-Sollwerte eingestellt werden

(Um das bestmögliche Bildergebnis zu erhalten (s. Abstract: Z. 1) wird der Bediener der Vorrichtung aus D1 klarerweise anstreben, die Fluoreszenz-Intensitäten auf Wunschwerte, also auf ihre Intensitäts-Sollwerte einzustellen. Logischerweise kann man dabei durch den Einsatz der Interferenzfilter die zugehörigen Anregungsbänder nicht über ihre jeweilige ursprüngliche Ausgangsenergie verstärken, sondern nur dämpfen).

- 2.2 Alle Schritte des Verfahrens nach Anspruch 1 sind demnach durch die Merkmale der Vorrichtung aus D1 vorweggenommen (Artikel 33(2) PCT).

Falls noch irgendwelche Unterschiede zwischen dem Offenbarungsgehalt des Dokuments D1 und dem Verfahren nach Anspruch 1 vermutet werden sollten, so beruhen diese jedenfalls nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von Artikel 33(3) PCT.

3. Die abhängigen Ansprüche 2 - 9 scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den diese Ansprüche rückbezogen sind, zu einem nach Artikel 33(3) PCT auf einer erfinderischen Tätigkeit beruhenden Verfahren führen könnten. Die Gründe hierfür sind:

- 3.1 **Anspruch 2:** Die Wahl gleicher Sollwerte für die Fluoreszenz-Intensitäten scheint eine naheliegende Option zu sein, da das Phänomen, dass die verschiedenen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild unterschiedliche Intensitäten aufweisen, ein in der Multiband-Fluoreszenz-Mikroskopie bekanntes Problem ist (vgl. Beschreibung: S. 1, Z. 8-10). Bei einer solchen Wahl kann der Sollwert dann zwangsläufig nicht höher als die niedrigste Fluoreszenz-Intensität sein.

- 3.2 **Anspruch 3:** In der Ausblendung eines bestimmten Fluoreszenzbandes kann keine erfinderische Idee gesehen werden.

- 3.3 **Anspruch 4:** Vergleiche Bemerkungen zu den Ansprüchen 2 und 3.

- 3.4 **Anspruch 5, 6 und 7:** Die Bestimmung von Fluoreszenz-Intensität auf visuelle

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Art (vorausgesetzt, die Fluoreszenz liegt im sichtbaren Bereich) sowie mit den anderen hier aufgeführten Mitteln gehört zum Stand der Technik – vergleiche D1 (Fig. 1: 14 und 15), D2 (Fig. 1: 24 und 23), sowie D3 (siehe z. B. S. 23, Z. 15-31).

- 3.5 **Ansprüche 8 und 9:** Das Phänomen, dass im Laufe der Zeit Änderungen der Fluoreszenz-Intensitäten stattfinden, wie z. B. durch das Fading, ist dem Fachmann bekannt, vergleiche etwa die Anmeldung (S. 1, Z. 16-18) oder D2 (Spalte 1, Z. 37-38). Daher wäre dem Fachmann bewusst, dass die Notwendigkeit für eine wiederholte Anpassung der Anregungsintensitäten besteht, wenn er die Fluoreszenz-Intensitäten auf den jeweiligen Sollwerten halten möchte. Bei einem Verfahren, das für die Anpassung der Anregungsintensitäten im ersten Schritt sich der Bestimmung eben jener Fluoreszenz-Intensitäten bedient, würde der Fachmann deshalb naheliegenderweise die Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten fortlaufend bestimmen, um somit bei einer Abweichung von den Sollwerten diese Fluoreszenz-Intensitäten unter Ausnutzung der Funktionsmerkmale der Vorrichtung auf ihre Sollwerte zu bringen, d. h. durch Anpassung der im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Filter.

Automatisierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie bekannt, insbesondere zur Änderung der Anregungsintensität, vgl. D4: Sp. 13, Z. 37-63.

4. **Anspruch 10**

- 4.1 Anspruch 10 definiert ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Anregungsfilter und einem Ausgangsfilter, das zur Beeinflussung der verschiedenen Anregungsbänder mit einem bestimmten Filterelement versehen ist. Dieses besteht im wesentlichen aus einem Satz von Filterschiebern, wobei sich auf jedem Filterschieber ein für jedes Anregungsband selektives Filter befindet, das Flächenbereiche mit hohen und niedrigen Transmissionsgraden aufweist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4.2 Neuheit und erfinderische Tätigkeit

(i) Keines der Dokumente D1 (siehe Fig. 2), D2 (siehe z. B. Fig. 7 und 8A-D, Sp. 9, Z. 48 bis Sp. 10, Z. 47), oder D4 (weniger relevant) beschreibt einen einzelnen Filterschieber, der (bei mehr als einem Anregungsband, siehe S. 22, Zeile 4-6 der Anmeldung) ein für jedes Anregungsband selektives Filter vorsieht. Das Dokument D3 definiert nicht das Merkmal, dass neben jedem Filter eine freie Öffnung mit dem Strahldurchmesser angeordnet sein muss, und beschreibt ferner keine Verstellmittel, mit denen ein beliebiger Flächenbereich des Filterschiebers in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden kann. Daher ist das in Anspruch 10 definierte Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop neu (Artikel 33(2) PCT).

(ii) Die dem Gegenstand von Anspruch 10 zu Grunde liegende Aufgabe besteht in der Schaffung der Möglichkeit, den Transmissionsgrad für jedes Anregungsband stufenlos einstellen zu können, und damit selektiv die zugehörige Fluoreszenz-Intensität zu verändern. Diese Aufgabe ist aus dem Dokument D1 bekannt und dort auf andere Weise als in der Anmeldung gelöst.

Auf der anderen Seite beschreibt Dokument D3 (siehe insbesondere S. 24, Z. 26-33, S. 26, Z. 3-29, sowie die Figuren 2, 10 und 13-14), das die o. a. Aufgabe kaum streift, rotierbare Filterschieber mit drei bzw. vier Filtern (siehe Fig. 13 und 14) als Anregungsfilter (siehe S. 26, Z. 8-12 in Verbindung mit S. 5, Z. 14-17). Ein solcher Filterschieber nach Fig. 13 oder 14 weist offenbar ein für jedes Anregungsband selektives Filter auf. Im selben Dokument wird die Möglichkeit zwar angedeutet, dass mittels eines solchen "rotating filter wheel 380" die Lichtintensität im Strahlengang zwischen Lichtquelle und Objekt zu kompensieren ist (siehe S. 11, Z. 16-18: "to compensate the intensity of ..."); konkret werden jedoch die oben erwähnten, rotierenden Filterräder nicht in 'Zwischenstellung' betrieben, d. h. sie drehen sich von einem Filter direkt zum nächsten Filter weiter (siehe S. 24, Z. 27 und S. 25, Z. 6-12), so dass sie offenbar auch nicht neben jedem Filter eine freie Öffnung mit dem Strahldurchmesser aufweisen (s. S. 32, Z. 20-29, Fig. 13-14); weiter wird nicht ein beliebiger Flächenbereich des Filterschiebers in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht. Vielmehr wird zur Beeinflussung eines einzelnen Wellenlängenbereichs lediglich ein Langpassfilter vorgeschlagen, d. h. nicht ein für jedes Anregungsband selektiv wirkendes Filter

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(siehe S. 26, Z. 20-26).

(NB: Wo der Einsatz weiterer rotierbarer Filter in D3 erwähnt wird – siehe z. B. S. 24, Z. 28-30, S. 25, Z. 31-37, S. 27, Z. 34-S. 28, Z. 3, S. 29, Z. 13-18 –, befinden sich diese 'jenseits' der Probe.)

Um die Fluoreszenzintensität der Anregungsbänder selektiv zu beeinflussen, würde die Lehre dieses Dokuments sowie der anderen Druckschriften aus dem Stand der Technik den Fachmann daher keinesfalls notwendigerweise zu einem Mikroskop nach Anspruch 10 bringen.

Der Gegenstand von Anspruch 10 ist daher nicht nahegelegt (Artikel 33(3) PCT).

5. **Ansprüche 11-21** betreffen bevorzugte Ausführungsformen des in Anspruch 10 definierten Fluoreszenzmikroskops und erfüllen – sofern sie wie unter Punkt VIII erläutert klargelegt werden (siehe oben) – ebenfalls die Kriterien von Artikel 33(2)-(4) PCT.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. **Anspruch 12:** In Zeile 19 von Seite 23 ist das Wort "der" (nach "zur") überflüssig (vergleiche auch S. 10, Z. 14 der Beschreibung).
2. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der **Regel 5.1 a) ii) PCT** wird in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1 und D3 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	
International application No. PCT/DE99/03768	Applicant's or agent's file reference E 0399 WO
International filing date (day/month/year) 27 November 1999 (27.11.99)	Priority date (day/month/year) 17 December 1998 (17.12.98)
Applicant WEISS, Albrecht	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
28 June 2000 (28.06.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Diana Nissen
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)